



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia  
2011

**Cristiana Célia  
Reis Lima da Silva**

**Sangue do Cordão Umbilical:  
Importância Clínico-Laboratorial**



**Cristiana Célia  
Reis Lima da Silva**

**Sangue do Cordão Umbilical:  
Importância Clínico-Laboratorial**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Isabel Leal Barbosa, Investigadora no Serviço de Terapia Celular do Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil, E.P.E. e coorientação da Professora Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

“O começo de todas as ciências é o espanto de as  
coisas serem o que são”

**Aristóteles**

## **O júri**

### **Presidente**

**Profª Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso**

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

### **Vogais**

**Profª. Doutora Isabel Leal Barbosa**

Investigadora no Serviço de Terapia Celular do Instituto Português de Oncologia do Porto  
Francisco Gentil, E.P.E. (Orientadora)

**Profª. Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha**

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro (Coorientadora)

**Profª. Doutora Maria Joana da Costa Gomes da Silva**

Professora Adjunta da Escola Superior de Saúde da Universidade de Aveiro (Arguente)

## **Agradecimentos**

Os meus agradecimentos vão para todos aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram e apoiaram a minha formação pessoal e profissional. Desta forma, não poderei deixar de agradecer:

Ao Professor Doutor António Carlos Matias Correia, coordenador do Mestrado de Microbiologia da Universidade de Aveiro, pelo incentivo para abordar este tema;

À Professora Doutora Isabel Leal Barbosa, do Serviço de Terapia Celular do Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil, E.P.E. orientadora científica desta dissertação e à Professora Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, coorientadora científica, pela disponibilidade, acolhimento, orientação e formação prestada;

À minha família, pelo apoio, compreensão, paciência e pelo estímulo constante à conclusão deste trabalho.

**Palavras-chave**

Sangue do cordão umbilical, células estaminais hematopoiéticas, transplante.

**Resumo**

O sangue do cordão umbilical é uma fonte de células estaminais hematopoéticas. As células estaminais são capazes de se diferenciar em vários tipos de células especializadas quando expostas a condições fisiológicas ou experimentais. Assim, a aplicação destas células na transplantação hematopoiética constitui uma revolução na compreensão dos mecanismos de reparação e regeneração de tecidos. Os requisitos essenciais para o armazenamento do sangue do cordão umbilical englobam o processamento, avaliação hematológica e funcional das células estaminais, tipagem do *Human Leucocyte Antigens*, avaliações serológicas e microbiológicas e criopreservação. Conflitos entre princípios morais e interesses económicos podem no entanto, ser um dilema na prática clínica de armazenamento do sangue do cordão umbilical.

**Keywords**

Umbilical cord blood, hematopoietic stem cell, transplant.

**Abstract**

The umbilical cord blood is a source of hematopoietic stem cells. The stem cells are able to differentiate in several types of specialized cells when exposed to physiological or experimental conditions. Thus, the application of these stem cells in the hematopoietic transplantation represents a revolution in the understanding of the mechanisms of tissue repair and regeneration. The essential requirements for the storage of umbilical cord blood include the processing, hematologic and functional evaluation of stem cells, Human Leukocyte Antigen typing, serological and microbiological assessment and cryopreservation. However, conflicts between moral principles and economic interests can be a dilemma in the clinical practice of umbilical cord blood storage.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XII</b>
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 Células Estaminais .....	1
1.2 Descoberta e Desenvolvimento das Células Estaminais.....	3
1.3 Propriedades do Sangue do Cordão Umbilical .....	5
1.4 Bancos de Sangue do Cordão Umbilical - Perspetiva Histórica .....	5
1.5 Bancos Públicos e Privados em Portugal .....	7
1.6 Objetivos .....	7
2. SELEÇÃO DE DADORAS E COLHEITA .....	8
2.1 Critérios de Doação .....	8
2.2 Consentimento Informado.....	9
2.3 Colheita de Sangue do Cordão Umbilical .....	10
3. PROCESSAMENTO LABORATORIAL DE SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL.....	13
3.1 Processamento.....	13
3.2 Criopreservação .....	14
4. ANÁLISES LABORATORIAIS DO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL .....	16
4.1 Avaliação Hematológica .....	16
4.1.1 Contagem de Células Nucleadas.....	16
4.1.2 Determinação do Grupo ABO/Rh.....	16
4.1.3 Estudo de Hemoglobinopatias .....	16
4.2 Contagem e Avaliação Funcional de Células Hematopoiéticas.....	17
4.2.1 Contagem de Células CD34+ .....	17
4.2.2 Determinação de Unidades Formadoras de Colónias.....	19
4.2.3 Determinação da Viabilidade .....	19
4.3 Tipagem <i>Human Leucocyte Antigens</i> .....	19
4.4 Avaliação Serológica .....	20
4.4.1 Testes Serológicos e de Ácidos Nucleicos .....	20



4.5	Avaliação Microbiológica .....	22
4.5.1	Culturas Microbiológicas.....	22
5.	APLICAÇÕES CLÍNICAS DAS CÉLULAS ESTAMINAIS DO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL.....	24
5.1	Transplantação Hematopoiética .....	24
5.2	Medicina Regenerativa .....	28
6.	BANCOS DE SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL PÚBLICOS OU PRIVADOS .....	32
7.	QUESTÕES ÉTICAS.....	35
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	37
9.	BIBLIOGRAFIA.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AAP** - Academia Americana de Pediatria  
**ASST** - Autoridade para Serviços de Sangue e da Transplantação  
**AVC** – Acidente Vascular Cerebral  
**BFU-E** - *Burst Forming Unit - Erythroid*  
**CD** - *Cluster of Differentiation*  
**CE** - Células Estaminais  
**CEH** - Células Estaminais Hematopoiéticas  
**CEM** - Células Estaminais Mesenquimatosas  
**CEPI** – Células Estaminais Pluripotentes Induzidas  
**CFU** – *Colony Forming Unit*  
**CFU-GEMM** - *Colony Forming Unit – Granulocyte Erythrocyte Monocyte Megakaryocyte*  
**CFU-GM** - *Colony Forming Unit – Granulocyte Monocyte*  
**CFU-S** - *Colony Forming Unit – Spleen*  
**CMV** – Citomegalovirus  
**CPD** – Citrato Fosfato Dextrose  
**CSF** - *Colony Stimulating Factor*  
**DECH** - Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro  
**DMSO** – Dimetilsulfóxido  
**EBMT** - *European Group for Blood and Marrow Transplantation*  
**FACT** - *Foundation Standards for Accreditation of Cellular Therapy*  
**G-CSF** - *Granulocyte - Colony Stimulating Factor*  
**GM-CSF** - *Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor*  
**HBS** – Hemoglobinas  
**HLA** - *Human Leukocyte Antigen*  
**HPLC** - *High Performance Liquid Chromatography*  
**HTLV** - *Human T Lymphotropic Virus*  
**ISHAGE** - *International Society for Hematotherapy and Graft Engineering*  
**LLA** - Leucemia Linfoblástica Aguda  
**MO** - Medula Óssea  
**PCR-SSP** – *Polimerase Chain Reaction – Sequence Specific Primers*  
**SCU** - Sangue do Cordão Umbilical  
**SR1** – *Stem Regenin 1*  
**VHB** - Vírus da Hepatite B  
**VHC** - Vírus da Hepatite C  
**VIH** - Vírus da Imunodeficiência Humana

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática das características das CE.....	1
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática da classificação das CE. ....	2
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática da diferenciação e maturação a partir das CE .....	4
<b>Figura 4:</b> Colheita de SCU evidenciando a punção na veia umbilical e o saco de colheita com CPD.....	11
<b>Figura 5:</b> Redução de volume pelo sistema automático Sepax 540 .....	12
<b>Figura 6:</b> Representação esquemática da técnica citometria de fluxo .....	16
<b>Figura 7:</b> Prevalência de transplantes de acordo com a fonte de células estaminais .....	23
<b>Figura 8:</b> Prevalência de transplantes em crianças com idade inferior a 18 anos de acordo com a fonte de células estaminais .....	23

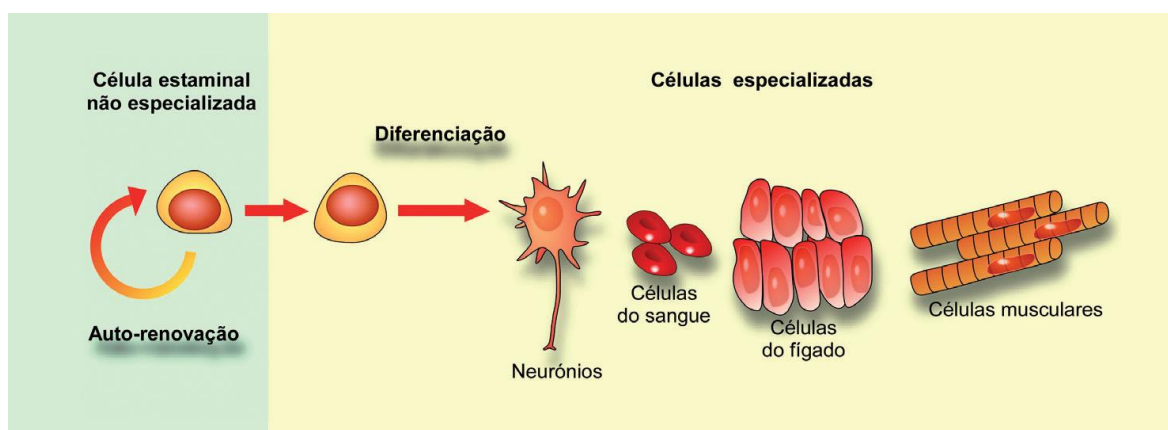
**LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1:** Microrganismos isolados do SCU .....24

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Células Estaminais

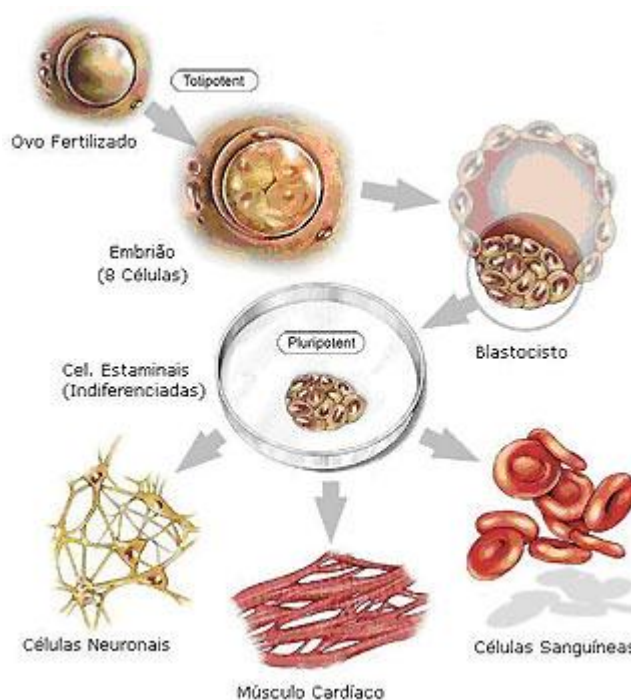
As células estaminais (CE) distinguem-se das restantes células do organismo por serem células indiferenciadas, não especializadas, com capacidade de se autorrenovar, dividir indefinidamente e de serem capazes de se diferenciar em linhagens celulares distintas (Gomes e Pranke, 2008; Cabeleira *et al*, 2010; Forraz e McGuckin, 2011). Apresentam ainda, grande plasticidade, pelo que podem modificar-se estruturalmente e funcionalmente para se adaptarem às condições ambientais (Onteniente e Polentes, 2011). Têm um enorme potencial para originar um grande número de células maduras durante a vida do organismo. Após a divisão por mitose, algumas diferenciam-se num tipo celular específico enquanto outras permanecem como CE (Figura 1).



**Figura 1:** Representação esquemática das características das CE. ([www.canalbq.spb.pt/docs/canalBQ\\_0007-4-17.pdf](http://www.canalbq.spb.pt/docs/canalBQ_0007-4-17.pdf). Acedido em 2/11/2011)

Assim, a diferenciação celular é o fenómeno através do qual as células se especializam e originam as diferentes células constituintes de um organismo (Kierszenbaum, 2007). Existem diversos tipos de CE que podem ser classificadas de acordo com a sua origem e a sua capacidade de diferenciação. Podem ser totipotentes, pluripotentes ou multipotentes. Durante a embriogénese, as CE totipotentes são provenientes do zigoto (oócito fecundado) e dos blastómeros (células obtidas após clivagem do zigoto, agrupadas em conjuntos de 2 a 8 células). O seu potencial é muito vasto pelo que podem dar origem a todas as células diferenciadas do organismo adulto, bem como aos anexos embrionários que são necessários ao desenvolvimento

intrauterino. Após alguns ciclos de divisão celular adicionais, as células totipotentes começam a especializar-se formando o blastocisto, estrutura embrionária na qual as células começam a perder o potencial de se diferenciar em todas as linhagens do organismo adulto (Figura 2). Este é composto por uma camada de células externas (trofoblasto) que formam uma cavidade (blastocélio). As células da massa interna do blastocisto denominam-se de pluripotentes. Apresentam também elevada capacidade de diferenciação, podendo dar origem a qualquer tipo de tecido do organismo, à exceção da placenta e dos tecidos extra-embrionários. As CE pluripotentes derivadas da massa interna do blastocisto são geralmente designadas como células estaminais embrionárias, que graças às suas características, são consideradas pela medicina regenerativa como uma potencial fonte de tratamento de numerosas patologias. À medida que as células pluripotentes se especializam, passam a constituir tecidos mais específicos e o potencial das CE passa a ser mais restrito, denominando-se de CE multipotentes (Gomes e Pranke, 2008; Cabeleira *et al*, 2010; Forraz e McGuckin, 2011).



**Figura 2:** Representação esquemática da classificação das CE ([www.cytothera.pt/pt/InformaçãoCientífica/AscélulasEstaminais.aspx](http://www.cytothera.pt/pt/InformaçãoCientífica/AscélulasEstaminais.aspx). Acedido a 2/11/2011).

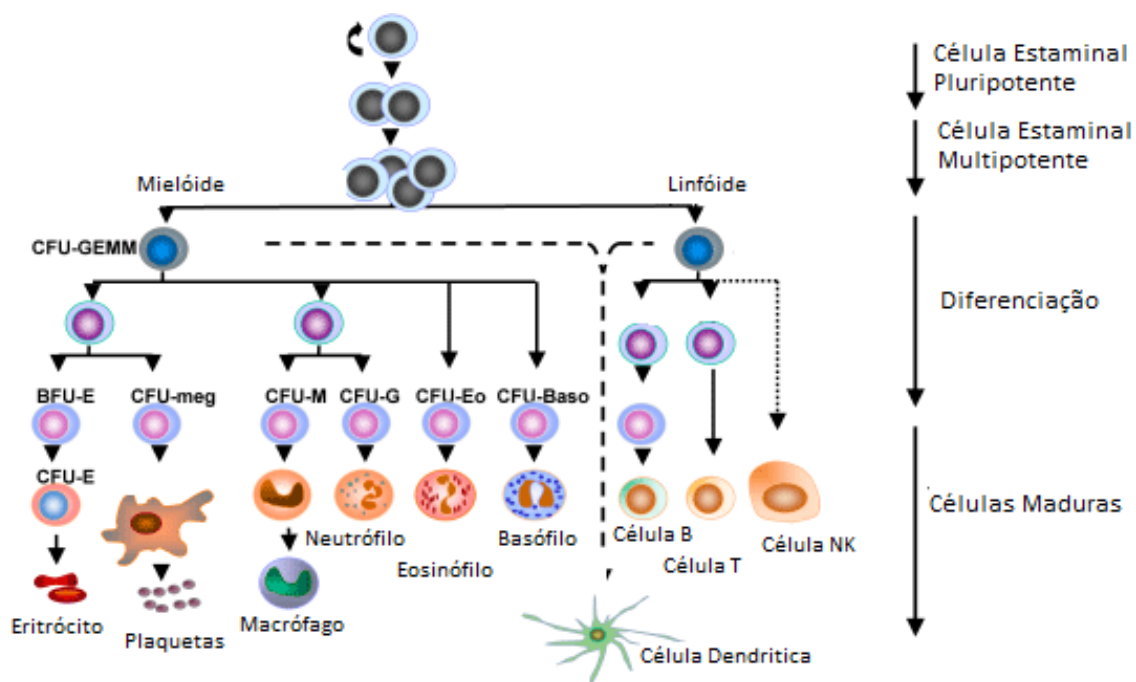
No organismo adulto é possível isolar CE multipotentes a partir de tecidos como a medula óssea (MO), sangue periférico, cordão umbilical, tecido adiposo, polpa dentária, cérebro, medula espinal, epitélio da pele, e também do fígado, pâncreas, córnea, retina e

tecido muscular, entre outros tecidos. Estas células são CE adultas e ajudam na reconstituição celular do organismo quando ocorre lesão ou remodelação de tecidos (Lubin e Shearer, 2007; Gomes e Pranke, 2008; Cabeleira *et al*, 2010). De forma geral, cada tipo de tecido corresponde um dado tipo de CE adulta e a lista de tecidos e órgãos dos quais foram isoladas CE tem vindo a crescer.

As CE adultas podem ser, hematopoiéticas, mesenquimatosas, endoteliais, entre outras. As células estaminais hematopoiéticas (CEH) apresentam grande capacidade de autorrenovação e potencial proliferativo, o que possibilita a sua diferenciação em células progenitoras de todas as linhagens sanguíneas e a reconstituição da população hematopoiética a partir de uma única célula. As células estaminais mesenquimatosas (CEM) são células indiferenciadas, com igual capacidade de autorrenovação e potencial proliferativo, contribuindo na regeneração de cartilagem (condrócitos), tecido adiposo (adipócitos), tecido ósseo (osteócitos) e tecido muscular (miócitos), pelo que a expansão destas células tem sido explorada para o uso clínico nas mais variadas áreas (Gomes e Pranke, 2008; Malgieri *et al*, 2010; Cabeleira *et al*, 2010). No entanto, as CEH são as que se encontram melhor caracterizadas e mais potencialidades se tem demonstrado no tratamento de diferentes patologias (Boitano *et al*, 2010).

## **1.2 Descoberta e Desenvolvimento das Células Estaminais**

A existência das CE foi demonstrada por uma experiência clássica de Ernest McCulloch e James Till, respetivamente biólogo e físico, em 1961. Estes investigadores irradiaram o baço e a MO de ratos, tornando-os acelulares e posteriormente injetaram-nos com células da MO (Till e McCulloch, 1961). Em poucos dias, constataram o aparecimento de colónias nos baços dos ratos que foram identificados como *Colony Forming Unit - Spleen* (CFU-S), constituídas por células capazes de regenerar células hematopoiéticas maduras. Atualmente, as CFU-S são CE pluripotentes, que especializando-se dão origem às CE multipotentes. Estas diferenciam-se em células da linhagem linfóide ou mielóide. As células da linhagem mielóide dão origem à linhagem dos leucócitos granulócitos, dos eritrócitos e megacariócitos (*Colony Forming Unit – Granulocyte Erythrocyte Monocyte Megakaryocyte*, CFU-GEMM) (Ciesla, 2007). As células linfóides diferenciam-se em linfócitos T, responsáveis pela imunidade celular e linfócitos B que promovem a imunidade humoral (Figura 3).



**Figura 3:** Representação esquemática da diferenciação das linhas celulares linfóide e mielóide (Adaptado de: [www.contanatura.weblog.com.pt/arquivo/2006/02/exodus.html](http://www.contanatura.weblog.com.pt/arquivo/2006/02/exodus.html). Acedido a 2/11/2011).

Cada uma destas CE evolui para a sua forma adulta por proliferação e diferenciação. Os fatores de crescimento, citocinas e interleucinas, são responsáveis individualmente pelo desenvolvimento de linhagens celulares específicas (Ciesla, 2007). Maioritariamente, estas substâncias são glicoproteínas produzidas por fibroblastos, linfócitos e macrófagos, que se ligam aos recetores celulares e têm como alvo células sanguíneas específicas (Kierszenbaum, 2007). Controlam a diferenciação e são responsáveis pela maturação e inibição do crescimento das CE (Ciesla, 2007). A indústria farmacêutica tornou possível a purificação e produção de citocinas como produto farmacêutico, designadamente a eritropoietina, o *Granulocyte – Colony Stimulating Factor* (G-CSF) e o *Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor* (GM-CSF). Todos estes produtos são usados para estimular a produção de células específicas de forma a obter benefício terapêutico para o doente. Geralmente são usados no tratamento da neutropenia (diminuição de neutrófilos no sangue) após quimioterapia ou transplante, para promover o aumento da contagem de neutrófilos (Ciesla, 2007; Kierszenbaum, 2007). A citocina eritropoietina é uma hormona produzida pelos rins que tem a capacidade de estimular a produção de eritrócitos (Ciesla, 2007).



A hematopoiese é a produção, desenvolvimento e diferenciação de células sanguíneas. A MO é extremamente versátil e serve o organismo com o fornecimento de células que têm uma multiplicidade de funções. São vários os órgãos envolvidos na hematopoiese e diferem do desenvolvimento fetal para a idade adulta. O saco vitelino, o fígado e o baço são os mais importantes no desenvolvimento fetal. Entre as duas semanas e os dois meses de vida do feto, a hematopoiese decorre no saco vitelino. Entre os dois e os 7 meses de vida fetal, o fígado, o baço, o timo e os gânglios linfáticos assumem o papel hematopoiético. Dos sete meses até ao nascimento, a MO assume o papel principal na hematopoiese, papel esse que se mantém até a vida adulta (Young *et al*, 2006; Ciesla, 2008; Kierszenbaum, 2008).

Knudtzon (1974), em 1974 foi o primeiro investigador a comprovar a presença de CE no sangue do cordão umbilical (SCU) *in vitro*. Já no final da década de 80, Broxmeyer (1989) e a sua equipa vieram confirmar a existência de CEH no SCU.

### **1.3 Propriedades do Sangue do Cordão Umbilical**

O cordão umbilical tem geralmente 1 a 2 cm de diâmetro e 30 a 90 cm de comprimento, sendo constituído por duas artérias e uma veia envolvidos por uma substância gelatinosa denominada geleia de Wharton. A veia umbilical contribui para o desenvolvimento do feto, com sangue rico em nutrientes e oxigénio proveniente da mãe. As artérias umbilicais transportam o sangue do feto com dióxido de carbono e resíduos. As CE do SCU obtêm-se puncionando a veia umbilical (Young *et al*, 2006; Forraz e McGuckin, 2011).

Estas células apresentam grande plasticidade e são menos imunogénicas que a CE da MO, sendo facilmente isoladas do SCU, que foi durante muito tempo desaproveitado e considerado lixo biológico. Desta forma, estão agora a ser criopreservadas em bancos públicos ou privados, para facilitar o seu uso em diversas terapias.

### **1.4 Bancos de Sangue do Cordão Umbilical - Perspetiva Histórica**

O primeiro banco de SCU de doadores voluntários foi estabelecido em 1991, pelo Dr. Pablo Rubinstein no New York Blood Center USA, o que encorajou a criação de muitos outros bancos distribuídos por todo o mundo (Rubinstein *et al*, 1994). Em 1993 foi

efetuado o primeiro transplante de células do SCU de um dador não aparentado com o doente e os primeiros relatos da evolução clínica dos transplantados foram publicados em 1996 (Kurtzberg *et al*, 1996). Constatou-se que houve reconstituição hematopoiética em quase todos os transplantados, na maioria crianças.

Atualmente existem cerca de 142 bancos públicos e 25 bancos privados por todo o mundo, envolvidos na colheita, processamento, análise e criopreservação de SCU para potencial uso futuro (McKenna e Sheth, 2011).

O surgimento de numerosos bancos de SCU tornou necessária a criação de uma rede, tanto a nível nacional como internacional, para a partilha das informações reunidas em cada banco, sendo em 1997 criado o NetCord (Navarrete e Contreras, 2009). A principal missão desta rede é estabelecer um registo internacional do SCU e desenvolver procedimentos e padrões de qualidade para o intercâmbio e uso clínico seguro das unidades de SCU, através de normas e procedimentos de acreditação. Este esforço culminou com o desenvolvimento do NetCord – *Foundation Standards for Accreditation of Cellular Therapy* (FACT), que fornece orientações mínimas para o desempenho dos bancos de SCU relativamente à colheita, processamento, criopreservação, armazenamento a longo prazo, seleção e envio da unidade para o recetor. Novas edições são publicadas de três em três anos para evidenciar os últimos desenvolvimentos e exigências de qualidade ([www.netcord.org](http://www.netcord.org)).

O NetCord é uma associação sem fins lucrativos dos bancos de SCU, cujos membros proporcionam uma grande fonte de SCU de alta qualidade para doentes que necessitam de transplante de CE. Têm atualmente cerca de 35 membros e registos que indicam um *stock* que ultrapassa as 211 mil unidades, representando cerca de 51% da oferta geral de sangue do cordão armazenado publicamente. Os bancos do NetCord já disponibilizaram mais de 10434 unidades de SCU para transplante em adultos e crianças ([www.netcord.org](http://www.netcord.org)).

Para complementar, foi criado um sistema para validação e avaliação das unidades de SCU. Este sistema, o Eurocord, foi estabelecido em 1999 e é responsável pela recolha e análise de todos os dados clínicos referentes a dadoras e à unidade de SCU para transplante em nome do grupo europeu de sangue e transplante de medula, *European Group for Blood and Marrow Transplantation* (EBMT). Desta forma, o Eurocord colabora com os bancos de SCU enviando-lhes anualmente ou quando pedido, análises estatísticas dos respetivos transplantes (Iacone *et al*, 2009; Navarrete e Contreras, 2009; NetCord-FACT, 2010). É uma organização que promove o avanço da investigação

científica, o desenvolvimento de aplicações terapêuticas e o progresso de conhecimentos relacionados com o cordão umbilical e a placenta ([www.eurocord.org](http://www.eurocord.org)).

## **1.5 Bancos Públicos e Privados em Portugal**

O LUSOCORD é o único banco público português de sangue de cordão umbilical. Foi fundado em 2009, e recebe as dádivas de SCU de todas as mães que pretendam doar para uso em transplantação alogénica e investigação.

Desta forma, o LUSOCORD tem como estratégia colaborar com centros nacionais e internacionais de transplantação, promover a investigação e desenvolvimento na aplicação das CE à medicina regenerativa, colaborando com instituições de saúde e universidades nacionais e internacionais ([www.chnorte.min-saude.pt/lusocord.php](http://www.chnorte.min-saude.pt/lusocord.php)).

O maior obstáculo à criação de bancos públicos reside nos elevados custos necessários à sua manutenção, o que pode impedir o seu funcionamento.

Dados da Autoridade para Serviços de Sangue e da Transplantação (ASST) indicam que em 2009 o LUSOCORD recebeu 944 unidades de SCU. No decorrer do ano 2010 10359 unidades foram recebidas, pelo que 5591 foram excluídos por não cumprirem os requisitos necessários desta instituição, dois dos quais: volume da unidade inferior a 40 ml e uma contagem total de células nucleadas inferior a  $1,2 \times 10^9$  ([www.asst.min-saude.pt](http://www.asst.min-saude.pt)).

OS bancos privados portugueses autorizados pela ASST são:

- Bebé Vida, Ciências Para a Vida, SA;
- *Biosckin Molecular and Cell Therapies*, SA (Criovida);
- Crioestaminal, Saúde e Tecnologia, SA;
- Instituto Valenciano de Infertilidade – Clínica de Reprodução Assistida, Lda.

Durante o ano de 2010 os bancos privados portugueses receberam 17489 unidades de SCU e foram rejeitadas 665 unidades ([www.asst.min-saude.pt](http://www.asst.min-saude.pt)).

## **1.6 Objetivos**

Esta dissertação consistiu numa revisão bibliográfica que teve como principais objetivos explorar as potencialidades das células estaminais presentes no SCU, demonstrar as fases de avaliação laboratorial realizadas no SCU e descrever as recomendações na utilização do SCU na transplantação hematopoiética.

## 2. SELEÇÃO DE DADORAS E COLHEITA

### 2.1 Critérios de Doação

De acordo com a legislação portuguesa em vigor (lei nº12/2009 de 26 de março e lei nº22/2007 de 29 de junho), os critérios de seleção de dadoras baseiam-se numa análise dos riscos relacionados com a aplicação do SCU. Devem ser identificados indicadores destes riscos por uma análise dos antecedentes médicos e comportamentais e por análises biológicas.

As dadoras devem ser selecionadas com base nos seus antecedentes sanitários e médicos, fornecidos num questionário e mediante entrevista realizada à dadora por um profissional de cuidados de saúde qualificado e formado.

Assim, não devem ser aceites dádivas em que se verifique os seguintes critérios:

- Antecedentes de doença de etiologia desconhecida;
- Existência ou antecedentes de doença maligna,
- Diagnóstico de doença de Creutzfeldt-Jakob, ou com a variante desta doença ou com antecedentes familiares de doença de Creutzfeldt-Jakob não iatrogénica;
- Pessoas com antecedentes de demência progressiva rápida ou com doenças neurodegenerativas, incluindo as de origem desconhecida;
- Pessoas tratadas com hormonas derivadas da hipófise humana (por exemplo, hormonas do crescimento) e recetores de transplantes da córnea, esclerótica e dura-máter;
- Infecção sistémica não controlada no momento da dádiva, incluindo infeções bacterianas, infeções virais, fúngicas ou parasitárias;
- Antecedentes, dados clínicos ou resultados laboratoriais que demonstrem a existência de risco de transmissão do Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) 1 e 2, hepatite B aguda ou crónica, exceto no caso de pessoas com um estatuto de imunidade comprovado, hepatite C e *Human T Lymphotropic Virus* (HTLV) I/II ou presença de fatores de risco comportamentais destas infeções;
- Antecedentes de doença crónica, sistémica e autoimune;
- Dados de outros fatores de risco de doenças transmissíveis, com base numa avaliação dos riscos que tenha em conta os antecedentes do dador em matéria de viagens e exposição, bem como a prevalência de doenças infecciosas locais;
- Presença, no corpo do dador, de sinais físicos que sugiram risco de doenças transmissíveis;

- Ingestão ou exposição a substâncias como cianeto, chumbo, mercúrio ou ouro, que possam ser transmitidas aos recetores em doses suscetíveis de pôr em risco a sua saúde;
- Antecedentes recentes de vacinação com vírus vivos atenuados, quando se considere que há risco de transmissão;
- Transplantação com xenotransplantes e transfusões sanguíneas.

## 2.2 Consentimento Informado

O consentimento informado é obtido quando as grávidas vão ao hospital cerca das 30 semanas de gestação, ou através de um formulário de consentimento que é preenchido antes do início do trabalho de parto (Armitage *et al*, 1999B; Navarrete e Contreras, 2009). Um aspeto importante deste processo é o fornecimento aos pais de informações claras e detalhadas sobre os testes necessários, o destino da unidade, especialmente em relação à natureza altruísta da doação (caso doado a banco público), e sobre o potencial uso de unidades clinicamente inadequadas para pesquisa e desenvolvimento. O consentimento deve portanto, ser livre, esclarecido, informado e inequívoco (Armitage *et al*, 1999B; Fernandez *et al*, 2003; Navarrete e Contreras, 2009; Petrini, 2010; Petrini e Farisco, 2011).

Entre outras recomendações do NetCord, eis alguns aspetos essenciais relativamente ao consentimento informado:

- O consentimento informado deve ser obtido e documentado pela mãe e enquanto esta é capaz de se concentrar na informação;
- A informação deve ser prestada por um profissional de saúde com formação específica nesta área, capaz de a transmitir de forma adequada e clara, usando termos facilmente compreensíveis pela dadora;
- A mãe deverá ter a oportunidade de fazer perguntas. Além disso, deve ser livre para retirar a autorização a qualquer momento;
- A informação deve mencionar a finalidade e a natureza da recolha, as suas consequências e riscos, os exames laboratoriais, o registo e a proteção dos dados relativos à dadora, o sigilo médico, o objetivo terapêutico e os potenciais benefícios;
- A mãe será convidada a indicar o historial médico familiar e pessoal, e posteriormente uma amostra de sangue materna será colhida para testes de doenças transmissíveis, testes genéticos, entre outros, sendo armazenados para testes futuros;

- O banco manterá a ligação com a mãe dadora, família e/ou seu médico de família com a finalidade de notificar doenças genéticas ou outras doenças eventualmente diagnosticadas;

- Informações relacionadas com o dador permaneceram confidenciais;

- Possibilidade de utilização da unidade para outros fins que não o transplante pode incluir pesquisa, controle de qualidade e estudos de validação (Kurtzberg *et al*, 2005; NetCord-FACT, 2010; Petrini, 2010; Petrini e Farisco, 2011).

De uma forma geral, o consentimento informado esclarecido e livre, é uma forma de manifestação de vontade que se destina a respeitar o direito do doente a decidir sobre a sua saúde, sendo fundamental que haja adequada informação para que o consentimento seja verdadeiramente esclarecido ([www.arsnorte.min-saude.pt](http://www.arsnorte.min-saude.pt)). Para a colheita de SCU, o consentimento informado é um processo pelo qual os profissionais de saúde e os pais refletem sobre as potencialidades associadas ao uso de SCU, demonstrando que todos dependem da medicina de transplante, de modo que tanto as crianças como os adultos podem precisar de SCU de um banco público (Busby, 2010).

### **2.3 Colheita de Sangue do Cordão Umbilical**

A estratégia de colheita é o primeiro passo para uma unidade de SCU de boa qualidade e varia entre os bancos e entre locais de colheita (Solves *et al*, 2003). Neste sentido, métodos de colheita diferentes têm sido propostos para otimizar o volume total e teor de células nucleadas das unidades de SCU. Existem duas técnicas principais para a recolha de SCU a partir da veia umbilical. Uma é realizada por enfermeiros e obstetras na sala de parto enquanto a placenta ainda está no útero (*in utero*) e a outra é efetuada numa sala adjacente após a expulsão da placenta (*ex utero*) por pessoal devidamente treinado proveniente do banco de SCU ou mesmo enfermeiros e obstetras. Qualquer um dos métodos apresenta vantagens e desvantagens. A vantagem do primeiro método é que o volume da unidade e células colhidas é geralmente mais elevado se o cordão umbilical for clampeado e a colheita iniciada imediatamente. No entanto, este método pode perturbar o processo normal do parto. A colheita *ex utero* é mais fácil e não há qualquer risco para a mãe e bebé mas, podem ser colhidas menos células e há um aumento do risco de contaminação bacteriana. Por outro lado, a colheita por sistema aberto, que foi inicialmente utilizada para colheita de SCU foi substituída por sistemas fechados com sacos de colheita para minimizar o risco de contaminação bacteriana

(Donaldson *et al*, 2000; Solves *et al*, 2003; Ballen, 2005; Kurtzberg *et al*, 2005; Ballen *et al*, 2008; Navarrete e Contreras, 2009; Malgieri *et al*, 2010; Volpe *et al*, 2011).

Solves *et al* (2003) demonstraram que a percentagem das unidades de SCU rejeitadas foi maior quando se realizou a colheita *ex utero*, tendo como causas um baixo volume de sangue e de células. Contudo, não verificaram diferenças significativas para estes parâmetros quando compararam o parto vaginal com a cesariana. Já Sparrow *et al* (2002) referiram não encontrar diferenças significativas entre estes dois métodos de colheita, embora confirmem a tendência para uma maior concentração de células em colheitas *in utero*.

Cerca de 52% de unidades de SCU colhidas são rejeitadas principalmente devido ao volume insuficiente da unidade e menor teor de células nucleadas. O volume de SCU colhido após a cesariana é maior do que o colhido após parto vaginal. Porém, o número total de células nucleadas é maior nas unidades colhidas após parto vaginal (Volpe *et al*, 2011).

Tanto no método *in utero* como *ex utero*, o cordão umbilical é garrotado com dois *clamps* e a área de colheita é desinfetada. De seguida, punciona-se o cordão e recolhe-se o sangue por gravidade para um saco especialmente concebido, contendo 21 ml de anticoagulante Citrato Fosfato Dextrose (CPD) (Figura 4). De salientar que todas as cesarianas também são processadas desta forma. Na colheita *ex utero*, a placenta é expulsa e transportada para local apropriado. *In utero* o cordão umbilical é logo garrotado (dentro de 30 segundos) e o sangue colhido o mais rapidamente possível (Ademokun *et al*, 1997; Armitage *et al*, 1999A; Honohan *et al*, 2002; Solves *et al*, 2003; Navarrete e Contreras, 2009; Volpe *et al*, 2011).

Desta forma, a estratégia de colheita representa um passo primordial para boa qualidade da unidade de SCU. Uma colheita realizada com sucesso deve apresentar um volume entre 60-250 ml (Wall e Chan, 2008; Lauder *et al*, 2010).



**Figura 4:** Colheita de SCU evidenciando a punção na veia umbilical e o saco de colheita com CPD (Forraz e McGuckin, 2011).

No que diz respeito aos locais de colheita, é importante selecionar as maternidades, não só com um elevado número de partos, mas também com uma população etnicamente mista de mães potencialmente dadoras, a fim de ampliar o perfil *Human Leucocyte Antigen* (HLA) das unidades nos bancos (Armitage *et al*, 1999B; Fernandez *et al*, 2003; Ballen, 2005; Lauber *et al*, 2010).



### 3. PROCESSAMENTO LABORATORIAL DE SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL

#### 3.1 Processamento

Nos anos que se seguiram à criação dos bancos de SCU, não era ainda claro se o intervalo de tempo entre a colheita e processamento podia afetar a qualidade das células estaminais. No entanto, o NetCord-FACT indica que todo o SCU deve ser tratado dentro de 24 horas após a colheita em qualquer sistema fechado ou numa sala limpa com o ambiente controlado (NetCord-FACT, 2010).

Inicialmente, a maioria das unidades armazenadas eram congeladas, sem qualquer manipulação, mas logo ficou claro que o armazenamento a longo prazo de grandes quantidades criaria um problema de espaço. Desta forma, tornou-se necessário reduzir o volume do SCU antes do armazenamento. Assim, foram introduzidos vários métodos de redução de volume. Broxmeyer (1992) observou uma perda significativa de CEH durante a separação das células pela técnica com Ficoll-Hypaque, enquanto que Charbord (1996) conseguiu um rendimento celular de 80% pela técnica PERCOL. No entanto, foram recentemente desenvolvidas novas técnicas, a maioria dos quais envolvendo a eliminação de eritrócitos e plasma, deixando o *buffy coat* (fração de uma unidade de sangue que contém os leucócitos) e mantendo a qualidade e quantidade de CE colhidas (Ademokun *et al*, 1997; Armitage *et al*, 1999A; Lauber *et al*, 2010) (Figura 5).



**Figura 5:** Redução de volume através do sistema automático utilizando o equipamento Sepax 540 (Navarrete e Contreras, 2009).

Uma consideração importante em qualquer método de redução de volume é a preservação do número máximo de células nucleadas e células CD34+ na camada de *buffy coat* (Navarrete e Contreras, 2009).

Atualmente, têm que ser feitos alguns testes antes do armazenamento de SCU, tanto no sangue da mãe como a unidade de SCU colhida, com e sem processamento. Outros testes podem ser necessários quando a unidade for selecionada para transplante.

### 3.2 Criopreservação

A criopreservação baseia-se no arrefecimento duma unidade de SCU a temperaturas muito baixas mantendo a sua viabilidade. A unidade é devidamente rotulada e colocada num recipiente de criopreservação onde ocorre a descida gradual de temperatura, a uma velocidade controlada, desde 5°C até -150°C. O controlo de descida de temperatura diminui a possibilidade de perda de viabilidade celular da unidade evitando a formação de cristais de gelo no interior das células (Berz *et al*, 2007).

Quando a unidade atinge a temperatura de -150°C é colocada num contentor de azoto líquido à temperatura de -196°C, podendo ficar criopreservada por tempo indeterminado. Estes contentores possuem dispositivos de controlo e alarme que detetam e assinalam a falta de energia elétrica e de corrente, sendo registadas as variações de temperatura, de modo a assegurar a integridade das unidades durante o período de armazenamento (Armitage *et al*, 1999B; Donaldson *et al*, 2000; Ballen, 2005; Berz *et al*, 2007; Smythe *et al*, 2007; Hunt, 2011). Existem vários equipamentos que podem ser utilizados, de acordo com a casa comercial, para este fim, como por exemplo *Cryocyte/Baxter* e o *CellFlex/Maco Pharma* (Berz *et al*, 2007). É geralmente adicionada uma solução de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) que tem uma função crioprotetora, impedindo a formação dos cristais de gelo e consequente rutura da célula (Honohan *et al*, 2002; Berz *et al*, 2007; Maligneri *et al*, 2010; Hunt, 2011). Aquando do descongelamento da unidade de SCU, ocorre um choque osmótico e consequentemente perda de células nucleadas e células CD34+ (Rubenstein *et al*, 1995). Aproximadamente 20% das CE podem ser perdidas durante o processo de descongelamento (Wall e Chan, 2008). Mugishina *et al* (1999) analisaram a viabilidade das células do SCU após 12 anos de criopreservação. Os seus resultados indicam que o SCU pode ser armazenado a longo prazo sem perda substancial de CE. Quando é selecionada uma unidade de SCU para

transplante, procede-se à descongelação em banho-maria a 37° (Castro Jr *et al*, 2001; Berz *et al*, 2007).

## **4. ANÁLISES LABORATORIAIS DO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL**

### **4.1 Avaliação Hematológica**

#### **4.1.1 Contagem de Células Nucleadas**

A contagem de células nucleadas é considerada o parâmetro mais importante relativamente à criopreservação ou não da unidade de SCU. A contagem consiste na determinação da quantidade de leucócitos existentes numa unidade de SCU. É efetuada através do hemograma e antes da criopreservação (Lauber *et al*, 2010). Geralmente, esta contagem é realizada nos bancos de colheita antes e após a manipulação, sendo os resultados essenciais para definir o limite de aceitabilidade relativamente à recuperação celular após manipulação. A unidade é inicialmente selecionada pelo número de células nucleadas totais (Iacone *et al*, 2009; Barker *et al*, 2011). Desta forma, a unidade deve conter no mínimo  $13 \times 10^8$  células nucleadas (Gluckman *et al*, 2011).

Segundo vários artigos científicos, a percentagem de sucesso de transplantes de SCU é mais elevada quando o transplante é efetuado com um número de células nucleadas maior ou igual a  $2,5 \times 10^7$ / Kg de peso do doente. Quando o número de células nucleadas presente na unidade é inferior a este valor, será provavelmente demasiado baixo para a realização do transplante. (Castro Jr *et al*, 2001; Wall e Chan, 2008; Iacone *et al*, 2009; Querol *et al*, 2009B; Barker *et al*, 2011).

#### **4.1.2 Determinação do Grupo ABO/Rh**

A determinação do grupo ABO/Rh do SCU é importante para evitar incompatibilidades ABO entre dador/recetor, pelo que também é um meio de escolha da unidade de SCU (Iacone *et al*, 2009).

#### **4.1.3 Estudo de Hemoglobinopatias**

O estudo de hemoglobinopatias, que incluem a  $\alpha$  e  $\beta$  talassemia e drepanocitose devem utilizar um método que distinga as hemoglobinas A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, S e F. A drepanocitose é uma patologia na qual os eritrócitos contêm uma forma anormal de proteína

transportadora de oxigênio, a hemoglobina S. A  $\alpha$  talassemia é caracterizada deficiência ou ausência da cadeia alfa da hemoglobina e a  $\beta$  talassemia pela deficiência de produção de cadeias beta existentes nas hemoglobinas A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e F. As formas graves das hemoglobinopatias mais comuns têm uma transmissão autossômica recessiva. Os portadores de uma mutação (heterozigóticos) não são doentes. No entanto, quando casam entre si, têm uma probabilidade de 25%, em cada gravidez, de originar filhos portadores de dois alelos mutantes (homozigóticos). Estes são doentes com um quadro clínico grave, geralmente associado com a elevada morbilidade e mortalidade (Ciesla, 2007).

A detecção de portadores de hemoglobinopatias é feita com base no hemograma e no estudo das hemoglobinas, e deve ser realizado antes de se disponibilizar a unidade de SCU para transplante. O estudo das hemoglobinas (Hbs) compreende uma eletroforese de Hbs e a quantificação de HbA<sub>2</sub> e F, preferencialmente, por técnicas como a *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (Iacone *et al*, 2009; Barker *et al*, 2011).

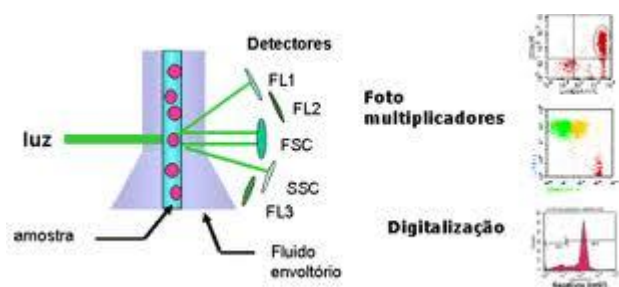
## **4.2 Contagem e Avaliação Funcional de Células Hematopoiéticas**

### **4.2.1 Contagem de Células CD34+**

A proteína CD34 é uma glicoproteína de membrana, usada como marcador característico da célula estaminal hematopoiética. Atualmente é recomendado o uso do protocolo da *International Society for Hematotherapy and Graft Engineering* (ISHAGE) para a determinação do teor de células CD34+ no SCU, em percentagem e em valor absoluto (Keeney *et al*, 1998). Este método baseia-se na aplicação da técnica de citometria de fluxo para a determinação de características celulares (Lauber *et al*, 2010).

A citometria de fluxo é uma técnica que permite fazer a separação e quantificação das diferentes populações celulares presentes numa unidade através das propriedades que estas apresentam, quando orientadas num fluxo laminar, de modo que cada célula passe individualmente num certo ponto de um canal, para o qual um feixe de *laser* está direcionado. O feixe do *laser* é então intercetado, sendo que o número de interferências é diretamente proporcional ao número de células presente. Os sinais produzidos pela interação das células com o feixe de luz podem ser sinais de dispersão e sinais de fluorescência. As modificações geradas no feixe de luz devidas à presença das células são detetadas e registadas. Os sinais são convertidos em sinais eletrônicos que são

posteriormente digitalizados sob a forma de histogramas ou *dot plots*, cuja interpretação permite a determinação simultânea de vários parâmetros da mesma célula que se relacionam com as suas características intrínsecas, como o tamanho, a complexidade e características antigénicas, o imunofenótipo (Figura 6).



**Figura 6:** Representação esquemática da técnica citometria de fluxo (www.fleury.com. Acedido a 2/11/11).

A imunofenotipagem é um processo de identificação celular através do uso de anticorpos monoclonais específicos para os antígenos expressos nas células. Estes antígenos são moléculas envolvidas na comunicação, adesão e metabolismo celulares para as quais existem anticorpos monoclonais específicos sintetizados laboratorialmente e usados para a classificação das células. Estes anticorpos são vulgarmente designados por *Cluster of Differentiation* (CD) e podem estar localizadas em diferentes partes da célula. Pode-se usar apenas um anticorpo ou determinadas combinações dos mesmos para definir populações celulares, usando-se diferentes fluorocromos (Becton e Dickinson, 2000). O protocolo ISHAGE baseia-se em quatro parâmetros medidos por citometria de fluxo mas tem sofrido alterações através da adição de marcadores de viabilidade celular e contagens absolutas num sistema de plataforma única (Keeney *et al*, 1998). Os quatro parâmetros medidos são o tamanho, complexidade da célula e expressão de CD45 (característico e expresso por todos os leucócitos) e CD34 (característico da célula estaminal hematopoiética) (Lauber *et al*, 2010).

Se a unidade tiver um número total de células CD34+ inferior a  $4 \times 10^6$ , o SCU não poderá ser criopreservado (Iacone *et al*, 2009; Gluckman *et al*, 2011). Tem sido demonstrado, que o aumento da dose de células CD34+ infundidas pode superar os problemas relacionados com a compatibilidade HLA (Lauber *et al*, 2010).

#### 4.2.2 Determinação de Unidades Formadoras de Colónias

A avaliação do potencial clonogénico (CFU-GM, *Burst Forming Unit - Erythroid* - BFU-E e CFU-GEMM) é realizada numa unidade de SCU antes e/ou depois da criopreservação. A determinação de CFU de uma unidade pré e pós criopreservação é fundamental para avaliar a capacidade funcional da unidade de SCU. Normalmente, os laboratórios utilizam meios de metilcelulose com fatores de crescimento (por exemplo, CSF e eritropoietina) para discriminar todos os tipos de colónias. São incubadas a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub> e observadas microscopicamente após vinte e um dias (Bartels *et al*, 2009; Lauber *et al*, 2010).

#### 4.2.3 Determinação da Viabilidade

Para avaliar se existe morte celular durante todo o processo é usada uma técnica de viabilidade celular que consiste na utilização do corante azul tripano e colocação na câmara de Neubauer para contagem celular (Berz *et al*, 2007).

#### 4.3 Tipagem *Human Leucocyte Antigens*

O sistema HLA está envolvido em mecanismos de reconhecimento celular, visando proteger o organismo de agressões externas e a resposta imunológica (Roitt *et al*, 1999).

Para que um transplante seja bem sucedido é necessário, entre outros fatores, que haja compatibilidade dador/recetor para moléculas codificadas pelos genes HLA pertencentes às classes I e II. Na atual rotina laboratorial dos exames de histocompatibilidade pré-transplante, são avaliados os locos HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DP e HLA DQ através de *Polimerase Chain Reaction – Sequence Specific Primers* (PCR-SSP) (Armitage *et al*, 1999B; Smythe *et al*, 2007; Wall e Chan, 2008; Gyurkocza *et al*, 2010).

A transmissão do sistema HLA segue um padrão autossómico e codominante, isto significa que um indivíduo expressa na superfície das suas células os produtos codificados pelos genes presentes nos cromossomas materno e paterno. Como cada progenitor possui dois cromossomas 6 distintos, são possíveis quatro diferentes combinações de haplótipos para a sua descendência (Roitt *et al*, 1999). Este padrão de hereditariedade é um fator importante na procura de dadores aparentados compatíveis

para transplante. Em geral, os transplantes de melhor prognóstico são aqueles realizados com irmãos HLA idênticos, o que tem uma probabilidade de ocorrência de 25% (Castro Jr *et al*, 2001; Lubin e Shearer, 2007).

Os HLA de classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C) encontram-se em praticamente todas as superfícies celulares. Esta classe corresponde a antígenos proteicos externos, incluindo em tecidos transplantados que são reconhecidos por linfócitos T com especificidade antígenoica. Os HLA de classe II (HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ) apenas se encontram em células que apresentam antígenos (APC), como os linfócitos B, macrófagos e células dendríticas. Desempenham o papel predominante na resposta imunitária inicial a antígenos de tecidos transplantados (Roitt *et al*, 1999).

A tipagem e compatibilidade HLA são determinadas quando é efetuado um transplante alogênico de células estaminais. Deste modo, quando são usadas células estaminais do SCU, por estas serem imunologicamente mais imaturas, não é estritamente necessário que haja uma compatibilidade total no sistema HLA, sendo geralmente possível realizar um transplante com uma incompatibilidade de dois alelos (Ballen, 2005; Iacone *et al*, 2009; Gyurkocza *et al*, 2010; Malgieri *et al*, 2010). Lee *et al* (2007) observaram que as incompatibilidades em HLA-B e HLA-C são melhor toleradas que as encontradas no HLA-A e HLA-DRB1. Já as incompatibilidades no HLA-DQ não parecem conferir grande risco (Lee *et al*, 2007).

#### **4.4 Avaliação Serológica**

##### **4.4.1 Testes Serológicos e de Ácidos Nucleicos**

Antes de ficar disponível para transplantação, cada unidade de SCU deve ser testada serologicamente e através de testes aos ácidos nucleicos para cada um dos seguintes agentes de doenças transmissíveis (NetCord-FACT, 2010):

- VIH tipo 1;
- VIH tipo 2;
- Vírus da hepatite B (VHB);
- Vírus da hepatite C (VHC);
- HTLV tipo I;
- HTLV tipo II;



- *Treponema pallidum* (Sífilis);
- Qualquer agente complementar exigido pela legislação aplicável no momento.

Os testes maternos são importantes para determinar o grau de infecciosidade do SCU. Assim, na amostra de sangue materno são realizados os mesmos testes que para a unidade de SCU e ainda o teste para o Citomegalovírus (CMV) (NetCord-FACT, 2010).

Para o VHB, VHC e VIH devem realizar-se sempre testes de amplificação dos ácidos nucleicos, sendo diretamente detetados o RNA do VHC e VIH e o DNA do VHB. Se os resultados dos testes são negativos, a unidade de SCU para transplante alogénico não aparentado é incluída no banco de SCU. Se os resultados da amostra materna forem positivos para Sífilis, a unidade de SCU é rejeitada, uma vez que pode ocorrer transmissão vertical.

Testes serológicos adicionais podem ser exigidos pelos centros de transplante, antes da disponibilização da unidade de SCU. Designadamente em Itália, os testes serológicos são realizados no sangue materno colhido após um intervalo de tempo desde a colheita inicial e entre 6 e 12 meses. Já no Reino Unido, os testes realizados no sangue da mãe exigidos pelos bancos de SCU, são os mesmos que os estabelecidos para os dadores de sangue. Com o encurtamento do período de janela de infecciosidade, pela introdução de técnicas de ácidos nucleicos para VIH, VHB, VHC, é possível eliminar a necessidade de realizar novo teste para doenças infecciosas nos 6 meses seguintes à primeira colheita. O rastreio adicional de Malária, doença de Chagas e mais recentemente, do vírus do Nilo Ocidental e da síndrome respiratória aguda grave, podem também ser incluídos nas análises, tendo em conta o país de origem da mãe e cumprindo com os regulamentos específicos de cada país (Ballen 2005; Iacone *et al*, 2009; Navarrete e Contreras, 2009).

## 4.5 Avaliação Microbiológica

### 4.5.1 Culturas Microbiológicas

As culturas microbiológicas são realizadas na unidade de SCU antes e após o processamento, utilizando um sistema que permite o crescimento de bactérias aeróbias, anaeróbias e fungos. As unidades de SCU não devem apresentar contaminação microbiana (Iacone *et al*, 2009; Lauber *et al*, 2010).

Segundo as normas do NetCord-FACT, as unidades de SCU destinadas a transplante alogénico aparentado, que demonstrarem crescimento bacteriano podem ser mantidas, após a identificação do microrganismo e respetivo antibiograma, pelo que os resultados devem ser comunicados ao centro de transplante em causa. No entanto, a deteção de contaminação em unidades de SCU destinadas a transplante alogénico não aparentado, implica a sua rejeição (Navarrete e Contreras, 2009).

As hemoculturas são incubadas a 37°C durante sete dias. Às hemoculturas positivas é realizado o Gram e são semeadas em meios de cultura (gelose de sangue e chocolate) para confirmação e identificação do microrganismo (Ademokun *et al*, 1997; Honohan *et al*, 2010). Riedel *et al* (2009) comparou dois sistemas de deteção de crescimento bacteriano em SCU (Bactec 9240 e BacT/Alert), concluindo que o Bactec 9240 seria o sistema mais adequado devido a rápida deteção. Nestes equipamentos os resultados são expressos na forma de um gráfico, onde é apresentada a intensidade da fluorescência com o decorrer do tempo. As alterações da fluorescência resultam da produção de CO<sub>2</sub> devido à metabolização dos substratos, que são detetadas pelo sensor presente no frasco. Ademokun e colaboradores (1997) relataram uma incidência de contaminação bacteriana nas unidades de SCU de 4%. As principais bactérias identificadas foram as da flora da pele. Um estudo realizado em Londres, durante os primeiros três meses de funcionamento de um banco de SCU, revelou uma percentagem de contaminação bacteriana de 28%. Contudo, melhores procedimentos e protocolos levaram posteriormente a uma redução para 4%. Desde então, a percentagem continuou a descer encontrando-se 1% de crescimento microbiano. Cerca de 75% das bactérias isoladas são da flora da pele e 10% da flora vaginal. As restantes são de origem fecal e ambiental (Armitage *et al*, 1999B).

Honohan *et al* (2002) determinaram uma incidência de contaminação microbiológica de 13% e apresentaram os microrganismos mais frequentes no SCU.

Catorze dos isolados foram classificados como patogénicos potenciais e oitenta como microrganismos de baixa patogenicidade (Tabela 1).

**Tabela 1:** Microrganismos isolados do SCU (Honohan *et al*, 2002).

Potential pathogens <sup>a</sup> (no. of contaminated units)	Micro-organisms of low pathogenicity <sup>b</sup>
<i>Escherichia coli</i> (1)	Coagulase-negative <i>Staphylococcus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> (1)	Diphtheroid rods
<i>Streptococcus agalactiae</i> (5)	<i>Propionibacterium</i> spp.
<i>Bacteroides</i> spp. (2)	<i>Streptococcus viridans</i>
<i>Candida albicans</i> (1)	<i>Lactobacillus</i>
<i>Haemophilus influenzae</i> (1)	Non-haemolytic <i>Streptococcus</i>
Strictly anaerobic Gram-negative rods (3)	<i>Bifidobacterium</i> spp.
	Anaerobic Gram-positive rods
	Fine anaerobic Gram-positive rods
	Microaerophilic Gram-positive rods
	Gram-negative rods (non-fermenters)
	Gram-positive coccus
	Anaerobic Gram-positive cocci

<sup>a</sup>n = 14. Micro-organisms of low pathogenicity were also isolated from a number of units.

<sup>b</sup>n = 80. Multiple micro-organisms of low pathogenicity were isolated from a number of units.

Um estudo realizado num banco de SCU em Taiwan analisou a prevalência de contaminação microbiológica no SCU durante dois anos (Chen *et al*, 2008). Demonstraram uma contaminação de 1,8%. Os microrganismos mais frequentemente isolados foram: *Streptococcus* do grupo B, *Candida tropicalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*, *Lactobacillus* spp., *Enterococcus*, *Bacteroides valgatus*, *Corynebacterium* spp., *Klebsiella pneumonia* e *Peptococcus* spp. Também verificaram que houve uma maior contaminação aquando a colheita realizada após parto vaginal (2,16%) do que a colheita realizada após cesariana (0,85%).

De acordo com dados fornecidos pelo LUSOCORD, a percentagem de contaminação microbiológica neste banco é de cerca de 20%.

## 5. APLICAÇÕES CLÍNICAS DAS CÉLULAS ESTAMINAIS DO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL

### 5.1 Transplantação Hematopoiética

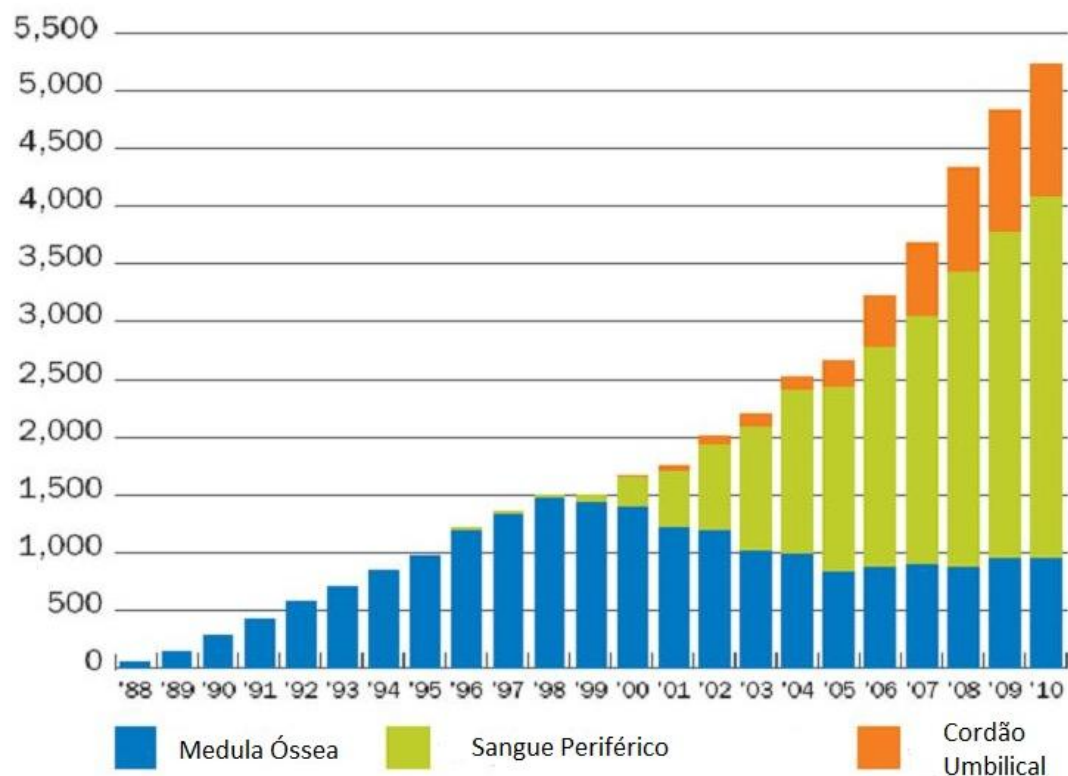
Os transplantes hematopoiéticos podem ser classificados numa das seguintes categorias (Ballen *et al*, 2008; Castro Jr *et al*, 2001):

- **Autólogo:** as CE são do próprio indivíduo;
- **Alogénico Aparentado:** as CE são de um dador e usado num determinado familiar;
- **Alogénico Não Aparentado:** as CE são de um dador não familiar e tornado disponível para uso num doente HLA compatível.

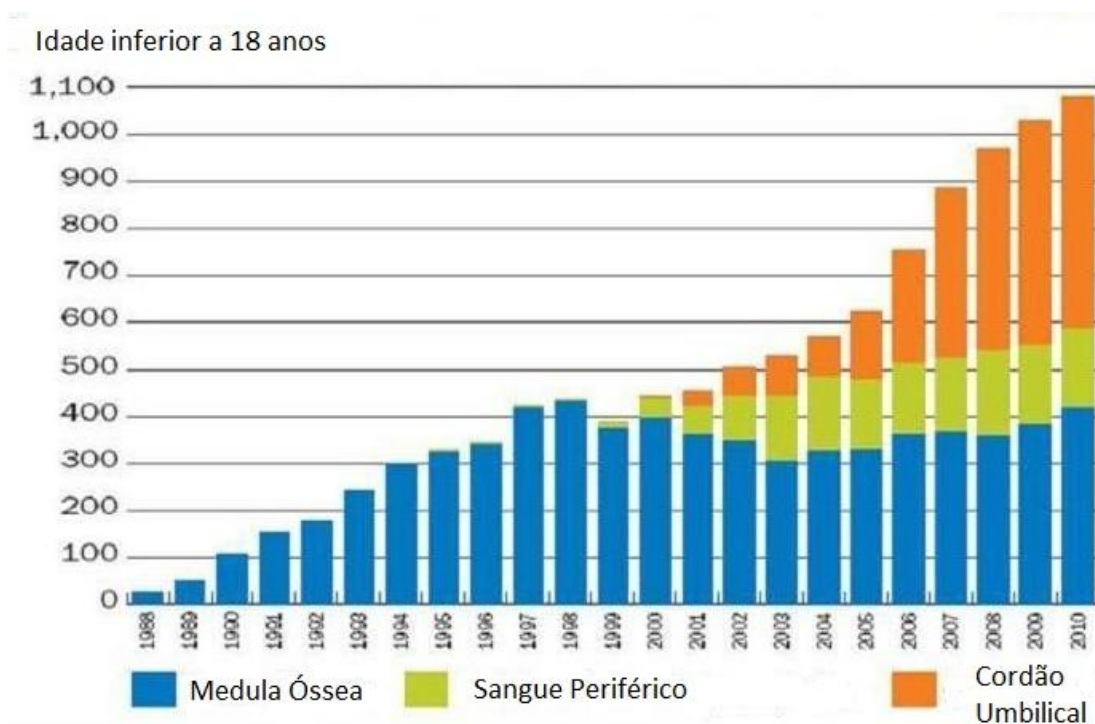
As CE do SCU apresentam inúmeras aplicações terapêuticas sobretudo na transplantação, ao nível das doenças hemato-oncológicas, sendo atualmente consideradas uma alternativa de CE de MO para doentes sem dadores compatíveis e para crianças.

Em 1988, Gluckman e colaboradores realizaram em Paris o primeiro transplante de células do SCU humano numa criança com anemia de Fanconi. Uma unidade de SCU de um familiar foi colhida e transplantada (Gluckman *et al*, 1989). Os primeiros sinais de sucesso surgiram 22 dias após transplante, com reconstituição hematológica completa. A criança não desenvolveu doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) e permaneceu saudável (Gluckman, 2009). Este procedimento veio, despoletar o interesse e acelerar a investigação sobre as células do SCU no tratamento de diversas doenças, o que contribuiu para a necessidade do seu armazenamento.

As CE inicialmente usadas em transplantação alogénica foram as da MO e posteriormente, a partir dos anos 90, as CE do sangue periférico. Globalmente, as CE do sangue periférico apresentam uma maior frequência de utilização terapêutica (Figura 7). No entanto, o SCU é atualmente o mais usado em crianças (Figura 8).



**Figura 7:** Prevalência de transplantes de acordo com a fonte de células estaminais hematopoiéticas (Adaptado de: [www.cordblood.org](http://www.cordblood.org). Acedido a 6/11/11).



**Figura 8:** Prevalência de transplantes em crianças com idade inferior a 18 anos de acordo com a fonte de células estaminais hematopoiéticas (Adaptado de: [www.cordblood.org](http://www.cordblood.org) Acedido a 6/11/11).

A eficácia destes tratamentos está já demonstrada para patologias como leucemias (linfocítica e mielóide), linfomas (Hodgking e não Hodgking), algumas anemias (anemia aplástica e anemia de Fanconi), mieloma múltiplo, hemoglobinopatias (drepanocitose e talassemias) e imunodeficiências (doença granulomatosa crônica, imunodeficiência combinada grave, síndrome Chediak-Higasi, doenças linfoproliferativas, síndrome de Kostman) (Kurtzberg *et al*, 2005; Ballen *et al*, 2008; Navarrete e Contreras, 2009; Gyurkocza *et al*, 2010; Bizzeto *et al*, 2011; Petrini e Farisco, 2011). Enquanto fonte de células estaminais, o SCU apresenta várias vantagens em relação à MO, nomeadamente, menor risco da DECH, possibilidade de uso com maior disparidade quanto ao sistema HLA, menor risco de infeção com microrganismos patogénicos e ainda, disponibilidade imediata das células para transplante (Lubin e Shearer, 2007; Smythe *et al*, 2007; Gomes e Pranke, 2008; Malgieri *et al*, 2010; Cabeleira *et al*, 2010; Proctor *et al*, 2001). A quantidade de células estaminais no SCU é um fator limitante para a aplicação em adultos sendo, no entanto, geralmente suficientes para reconstrução da medula em crianças (Castro Jr *et al*, 2001; Smythe *et al*, 2007; Cabeleira *et al*, 2010). Uma unidade SCU é geralmente adequada para uma criança de 20-30 kg de peso corporal. Se o indivíduo é mais pesado, é necessário mais do que uma unidade. Neste sentido, o transplante de mais do que uma unidade de SCU em adultos está a ser estudado como estratégia para o aumento da dose de CE, assim como a sua expansão *ex vivo* (Lubin e Shearer, 2007; Chou *et al*, 2010, Doan e Chao, 2010; Petrini e Farisco, 2011). Além disso, a administração de 2 unidades quando comparada com a administração de apenas uma unidade, está associada a um aumento na recuperação hematopoiética (Robinson *et al*, 2011).

A disparidade HLA leva à ativação dos linfócitos T e conseqüente à ativação e produção de mediadores celulares capazes de iniciar toda resposta imunológica, resultando na DECH. Esta é uma das complicações que podem surgir na sequência de um transplante alogénico. Contudo, as células do SCU são imunologicamente mais imaturas diminuindo significativamente o desenvolvimento desta doença (Gyurkocza *et al*, 2010).

As recomendações atuais para a escolha de uma unidade de SCU para transplante são as seguintes (Gluckman, 2009; Sideri, *et al*, 2011):

1. Unidades de SCU com duas ou menos incompatibilidades HLA e uma contagem de células nucleadas superior a  $3 \times 10^7/\text{Kg}$  de peso do doente ou uma contagem de células CD34<sup>+</sup> superior ou igual a  $2 \times 10^5/\text{Kg}$ ;

2. Em doenças não malignas, em que o risco de rejeição é superior, a dose deve ser aumentada, devendo ser evitadas unidades com menos de  $3,5 \times 10^7/\text{Kg}$  de células nucleadas assim como aquelas que correspondam a duas ou mais incompatibilidades HLA;

3. Caso não haja uma unidade com estas características, selecionar duas unidades com um total de células nucleadas  $\geq 3 \times 10^7/\text{Kg}$  e se possível, não mais de uma incompatibilidade HLA entre as duas unidades e o doente.

Até ao final de 1990, ficaram disponíveis os primeiros resultados de transplantação em crianças com leucemia aguda (Brunstein, 2011). Não havendo um irmão compatível, a disponibilidade de transplante alogénico não aparentado varia de acordo com a etnia, sendo cerca de 85% para doentes caucasianos e de 60% para doentes negros (Thornley *et al*, 2009).

Dada a incidência anual de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) em crianças dos 0 aos 9 anos (30,6/milhão para indivíduos brancos e 15,9/milhão para indivíduos negros) e as percentagens de recaída (20% e 90% respetivamente), as probabilidades de um recém-nascido desenvolver LLA durante a infância, podendo ter uma recaída e sem um dador compatível para transplante alogénico é cerca de 12,4/milhão para indivíduos caucasianos e 17,2/milhão para indivíduos negros (Thornley *et al*, 2009).

Um estudo recente sobre o tratamento da leucemia aguda em crianças que receberam transplante de SCU mostrou que em 84% dessas crianças a capacidade de recuperação de neutrófilos foi 80%, a taxa de recaída em dois anos foi de 20%, e a percentagem sobrevivência foi de 50% em dois anos (Kurtzberg *et al*, 2008). Um estudo realizado em doentes adultos com leucemia, com o objetivo de avaliar as três fontes de CE mais comumente usadas para transplante alogénico, revelou que o SCU é uma alternativa aceitável (Eapen *et al*, 2010). Estes resultados são particularmente notáveis visto que 70% dos transplantes de SCU apresentavam duas disparidades no sistema HLA comparativamente à MO e sangue periférico, que não apresentavam disparidade HLA.

Em doentes adultos com síndrome mielodisplásico a recuperação após transplante de SCU dos neutrófilos foi de 90% com uma percentagem de recaída de 16% e uma capacidade de sobrevivência de 70% em cinco anos (Sato *et al*, 2011).

Um estudo realizado pela Eurocord demonstrou que doentes com linfoma e que receberam transplante de SCU apresentaram uma recuperação de neutrófilos de 84% e uma sobrevivência de 40% em dois anos (Rodrigues *et al*, 2009; Brunstein, 2011).

Na anemia aplástica grave, doença com uma incidência anual de cerca de 3/milhão, o transplante de dador aparentado é a abordagem mais indicada em crianças com diagnóstico recente. O transplante de dador não aparentado é reservado para aqueles com uma resposta inadequada à terapia com imunossupressores. Historicamente, a capacidade de sobrevivência é de 90% após transplante de dador aparentado e de 50% a 60% após transplante de dador não aparentado (Thornley *et al*, 2009).

## **5.2 Medicina Regenerativa**

A área da ciência que estuda os processos para reparação e substituição de tecidos ou órgãos que perderam as suas funções devido ao envelhecimento, doença, lesões ou anomalias congénitas, em que a resposta do próprio organismo não é suficiente para restaurar o tecido funcional, é denominada de medicina regenerativa. (Cabeleira *et al*, 2010; Malgieri *et al*, 2010).

As experiências em modelos animais sugerem que, no futuro, a gama de aplicações poder-se-á alargar a doenças neurodegenerativas, diabetes e doenças cardiovasculares (Cabeleira *et al*, 2010; Malgieri *et al*, 2010). Devido ao potencial das CEM em se diferenciarem em múltiplos tecidos encontram-se atualmente a decorrer ensaios clínicos de fase I e II com vista a testar as possíveis aplicações terapêuticas (Trounson *et al*, 2011)

As doenças cardiovasculares são uma das principais causas de morte por todo o mundo, constituindo um dos grandes desafios da medicina atual. Uma vez que a capacidade de regeneração do músculo cardíaco é bastante limitada, têm sido testadas estratégias de terapia celular, recorrendo a CE adultas, cujos efeitos estão a ser atualmente avaliados. Diversos trabalhos em modelos animais, têm demonstrado que as células do SCU contribuem para a angiogénese. Geralmente, ocorre migração das CE para o tecido danificado, observando-se um aumento da densidade de capilares no local, diminuição da área do enfarte e consequentemente melhoria da função cardíaca (Ma *et al*, 2005; Reimann *et al*, 2009; Cabeleira *et al*, 2010; Schlechta *et al*. 2010).

O sistema nervoso central está sujeito a diferentes lesões e doenças designadamente traumatismos crânio-encefálicos, acidentes vasculares cerebrais (AVC), lesões da medula espinal, esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson, doença de Alzheimer e doença de Huntington, entre outras. Estima-se que 15 milhões de pessoas em todo o mundo sofrem um AVC a cada ano, com consequências dramáticas para as populações



mais desfavorecidas. Nestes casos, a capacidade de regeneração é reduzida, pelo que a terapia com CE também poderá contribuir na regeneração neural, levando à recuperação funcional dos doentes. A capacidade que as células do SCU possuem para se diferenciarem em vários tipos de células neuronais parece ser um dos fatores importantes para a regeneração das lesões da medula espinal que foi demonstrada em ratos. O transplante de CEM na medula espinal lesionada pode ter como benefícios a compensação por desmielinização, a promoção da regeneração axonal, a direção de axónios para alvos apropriados, a substituição de células perdidas e naturalmente a recuperação da função motora (Cabeleira *et al*, 2010; Malgieri *et al*, 2010; Chen e Clowry, 2011; McKenna e Sheth, 2011; Trounson *et al*, 2011). Um dos casos de aplicação de CEM do SCU para o tratamento de uma lesão na medula espinal envolveu uma mulher de 37 anos. As células foram transplantadas no local afetado e os resultados mostraram regeneração da lesão medular, pelo que a doente apresentou melhorias na perceção sensorial e de mobilidade (Kang *et al*, 2005). Na doença de Parkinson, de Alzheimer e de Huntington, a infusão endovenosa de CE parece retardar a progressão da doença e o aparecimento dos sintomas, com prolongamento do tempo de vida. Da mesma forma, a administração endovenosa de sangue do cordão umbilical em ratinhos com AVC induz angiogénese no tecido isquémico, contribuindo para a neurogénese e redução da área afetada (Reimann *et al*, 2009; Ali e Bahbahani, 2010; Cabeleira *et al*, 2010; Chen e Clowry, 2011; McKenna e Sheth, 2011; Onteniente e Polentes, 2011; Trounson *et al*, 2011). As CE possuem ainda propriedades imunomoduladoras. Diminuem a resposta inflamatória local pela redução da ativação de macrófagos (Ohtaki *et al*, 2008). O efeito do SCU parece depender do momento exato do transplante após a lesão, da dose de células do SCU e do método de transplante. A infusão intravenosa foi sugerida como mais eficaz do que a infusão direta de células no local da lesão (Chen e Clowry, 2011).

As CE do SCU também se têm mostrado promissoras no tratamento de paralisia cerebral em modelos animais. A paralisia cerebral é uma doença que afeta numerosas crianças por todo o mundo, com cerca de 10000 novos casos diagnosticados anualmente (Malgieri *et al*, 2010). Um ensaio clínico desenvolvido pela Duke University nos EUA, está a realizar transplantes autólogos de SCU em crianças com paralisia cerebral, por um período de dois anos. Têm sido observados resultados animadores relativamente aos progressos a nível motor e de desenvolvimento em algumas crianças (Reimann *et al*, 2009; Ali e Bahbahani, 2010; Cabeleira *et al*, 2010; Malgieri *et al*, 2010).

A diabetes tipo 1 é uma doença resultante da destruição autoimune das células  $\beta$ -pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina. Ocorre geralmente na infância e

adolescência. O transplante autólogo de SCU foi já alvo de avaliação através de um ensaio clínico para o tratamento de diabetes tipo 1 em crianças (Haller *et al*, 2008). Alguns autores referem que até o momento, neste ensaio, as crianças apresentaram um atraso na função das células  $\beta$ -pancreáticas (Reimann *et al*, 2009; Cabeleira *et al*, 2010; Malgieri *et al*, 2010).

As doenças autoimunes incluem a artrite reumatoide, lupus eritematoso sistêmico e esclerose múltipla. O transplante de CEM foi sujeito a uma valiação como estratégia para o alívio da nefrite lúpica em modelo animal (Chang *et al*, 2011). Verificou-se que retardou significativamente o desenvolvimento de proteinúria, diminuindo os níveis de anti-dsDNA (anticorpos específicos do lupus eritematoso sistêmico) e inflamação renal.

Estão em desenvolvimento ensaios clínicos relativos à utilização de CE com vista a ampliar as suas aplicações, sendo utilizado maioritariamente CEM da medula óssea e SCU, e tanto as CE adultas como embrionárias estão envolvidas em ensaios de Fase I e II. Uma vez que estes ensaios estão em fase de início, é ainda cedo para concluir sobre os resultados (Trounson *et al*, 2011).

A escolha do tipo de células adequadas para a terapia celular deve ter em conta o tamanho da lesão e a natureza do tecido que se pretende tratar (Senegaglia *et al*, 2009). A expansão *ex vivo* é essencial para superar limitações como por exemplo no transplante de CE em adultos. No entanto, a descoberta de novas moléculas continua a ser uma importante meta de investigação (Robinson *et al*, 2011). Boitano e colaboradores (2010) relataram recentemente uma purina denominada *Stem Regenin 1* (SR1) que impulsiona a expansão significativa CE *ex vivo*. SR1 é um antagonista do aril hidrocarboneto e tem sido implicado na regulação CE. Na presença de SR1 o número de células CD34+ aumentou cerca de 50 vezes. No entanto, a ação de SR1 depende da presença de outras moléculas, designadamente, citocinas e fatores de crescimento. Diferentes graus e combinações de citocinas como as interleucinas, eritropoietina, Flt-3 ligante, entre outros, têm sido testados para otimizar os seus efeitos de diferenciação e proliferação (Conrad e Emerson, 1998; McKenna e Brunstein, 2011; Robinson *et al*, 2011).

A criação de células estaminais pluripotentes induzidas (CEPI) pela introdução de quatro genes, o Oct-4, Sox-2, Klf-4 e c-Myc em fibroblastos, foi recentemente descoberta (Takahashi e Yamanaka, 2006). Um grande avanço foi conseguido durante os últimos cinco anos, mas a pesquisa das aplicações terapêuticas das CEPI continua a ser um tema relevante em biologia celular. As CEPI apresentam-se semelhantes às células estaminais embrionárias humanas em muitos aspetos, como por exemplo, a morfologia, capacidade de diferenciação e expressão de marcadores pluripotentes (Ali e Bahbahani,

2010; Barile *et al*, 2011; Egashira *et al*, 2011). Neste sentido, podem ser uma alternativa às células estaminais embrionárias evitando as questões éticas associadas ao seu uso (Barile *et al*, 2011; Egashira *et al*, 2011). No âmbito cardiovascular, o uso de CEPI é visto como um complemento ou substituto do transplante cardíaco. As CEPI podem diferenciar-se em cardiomiócitos e após transplante, melhorar a função cardíaca em caso de doença (Egashira *et al*, 2011). As CEPI são originadas pela introdução de transgenes, principalmente através de vetores virais que integram o genoma do hospedeiro (Egashira *et al*, 2011). Contudo, têm sido detetadas anomalias genéticas nestas células pelo que é necessário caracterizar e avaliar essas alterações antes de se testar as CEPI em ensaios clínicos (Barile *et al*, 2011; Trounson *et al*, 2011).

## 6. BANCOS DE SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL PÚBLICOS OU PRIVADOS

As potencialidades demonstradas no tratamento de doenças hemato-oncológicas têm levado ao aumento do número de transplantes de SCU nos últimos anos. No entanto, para a usufruir das suas vantagens em caso de uma futura doença é necessário o seu armazenamento, pelo que as famílias têm duas opções: o armazenamento em bancos públicos ou em bancos privados.

Os bancos de SCU privados são empresas com fins lucrativos que facilitam a recolha e armazenamento de sangue de cordão umbilical para eventual utilização futura por parte da criança de quem ela foi obtida, ou por um familiar da mesma (Kurtzberg *et al*, 2005; Thornley *et al*, 2009; Busby, 2010).

Em Portugal, existem vários bancos privados. O valor cobrado pela colheita, realização de testes e armazenamento de 15 a 25 anos, varia entre os 1000 e 2500 euros. O LUSOCORD com sede no Centro de Histocompatibilidade do Norte é o único banco público de SCU.

No entanto, têm sido apresentados alguns argumentos científicos contra o armazenamento do SCU para uso autólogo (Fisk *et al*, 2005; Lubin e Shearer, 2007; Ballen *et al*, 2008; Gassas, 2011; McKenna e Sheth, 2011; Petrini e Farisco, 2011):

- A probabilidade de que o SCU armazenado seja usado no próprio indivíduo é muito baixa nos primeiros 20 anos de vida (1/1000 a 1/200000);
- Se as células estaminais forem necessárias podem ser colhidas da MO ou sangue periférico;
- Não é a melhor opção para o tratamento de doenças genéticas, como a leucemias, hemoglobinopatias e imunodeficiências.

Apesar dos argumentos científicos de várias organizações a nível nacional e internacional desencorajarem a conservação para uso autólogo, o armazenamento do SCU tem crescido consideravelmente, fruto do marketing agressivo por parte dos bancos privados para colheita e armazenamento de SCU persuadindo os pais a um possível uso futuro (Kurtzberg *et al*, 2005; Ballen *et al*, 2008; Petrini e Farisco, 2011).

Em 1997, o Colégio Americano de Obstetrícia e Ginecologia declarou que os pais não devem comprar este serviço sem uma avaliação realista do provável retorno do seu investimento (Thornley *et al*, 2009). Posteriormente, em 1999, a Academia Americana de Pediatria (AAP) recomendou que, dada a dificuldade de fazer uma estimativa exata da necessidade de transplante autólogo e com disponibilidade imediata em caso de

transplante alogénico, o armazenamento privado de SCU como "seguro biológico" é imprudente. No entanto, o armazenamento deve ser considerado se houver um membro da família com a necessidade atual ou potencial de transplante de SCU (Thornley *et al*, 2009). A AAP reafirmou esta visão em 2007 e o Conselho de Assuntos Éticos e Judiciais da Associação Médica Americana e da Sociedade Americana de Transplante de Sangue e Medula Óssea adotou posições semelhantes (Thornley *et al*, 2009).

As famílias podem, portanto, optar por armazenar o SCU num banco privado na eventualidade de um possível uso. Quando armazenado na ausência de um previsível transplante na família, o SCU é visto como uma forma de "seguro biológico", pelo que o armazenamento não deve ser indicado nos bancos privados. Contudo, a escolha continua a ser da família e das suas condições económicas (Lubin e Shearer, 2007; Thornley *et al*, 2009; Gassas, 2011; McKenna e Sheth, 2011).

Neste contexto, a doação em banco público é sempre recomendada. Essas doações vão aumentar a disponibilidade de SCU e em particular para minorias étnicas, dada a dificuldade de encontrar dadores compatíveis (Lubin e Shearer, 2007; Gassas, 2011). De uma maneira geral, seria desejável cada país desenvolver o seu próprio programa de banco de SCU, o que aumentaria a diversidade de unidades e dadores disponíveis. Internacionalmente seria possível garantir o acesso universal ao tratamento com CE do SCU (Querol *et al*, 2009A; Querol *et al*, 2009B). Com o crescimento do número de unidades de SCU, é necessário melhorar a qualidade das dádivas e a gestão da relação custo-benefício pelos bancos. O número ideal de unidades de SCU armazenadas não é rigorosamente conhecido, mas estima-se em cerca de 9 unidades por 10 000 habitantes (Gluckman, 2009). Recentemente, Querol *et al* (2009A) mostrou que para a situação do Reino Unido, um banco que contenha 50 000 unidades é ideal, uma vez que otimiza a probabilidade de encontrar unidades adequadas relativamente ao esforço de colheita e armazenamento.

Os desafios que os bancos apresentam incluem não apenas aqueles relacionados com o processo de recrutamento das dadoras, a elegibilidade dos laboratórios e desenvolvimento de políticas médicas, mas também aqueles associados com a distância geográfica e diversidade da cultura e nível socioeconómico (Fernandez *et al*, 2003; Reed *et al*, 2003).

O debate sobre a utilidade dos bancos de sangue privados persiste. Inúmeras questões levantadas relativamente aos bancos de SCU privados, incluindo a vulnerabilidade dos pais perante o marketing, o rigor das informações disponíveis para os pais, a qualidade da compreensão dos pais aquando da tomada de decisão sobre o

banco com quem estabelecer contrato e a competição com os bancos públicos que facilitam transplantes de doadores não relacionados, merecem atenção e preocupação (Thornley *et al*, 2009).

Pediatras, médicos de família, obstetras, parteiras, enfermeiros e outros profissionais que trabalham com as famílias, devem educar os futuros pais na perspectiva de uma visão de consenso (Fisk *et al*, 2005; Thornley *et al*, 2009).

## 7. QUESTÕES ÉTICAS

O Grupo Europeu de Ética para a Ciência e Novas Tecnologias, defende que existem diferentes princípios éticos fundamentais ([www.ec.europa.eu](http://www.ec.europa.eu)):

- O princípio do respeito pela dignidade e integridade humana, que afirma a princípio da não comercialização do corpo do ser humano;
- O princípio da autonomia ou o direito à autodeterminação com base na completa e correta informação;
- Os princípios de justiça e solidariedade, no que diz respeito ao acesso justo aos serviços de saúde;
- O princípio da beneficência, ou a obrigação de fazer o bem, especialmente na área dos cuidados de saúde;
- O princípio da não maleficência, ou a obrigação de não fazer mal, incluindo a obrigação de proteger os grupos vulneráveis, para respeitar a privacidade e confidencialidade;
- O princípio da proporcionalidade que implica um equilíbrio entre meios e objetivos.

De referir que, os valores da liberdade e da livre iniciativa podem entrar em conflito com os princípios da solidariedade e da justiça, pelo que o acesso aos cuidados de saúde deve estar numa base equitativa e de acordo com as necessidades reais, bem como com o princípio da proteção de grupos vulneráveis ([www.ec.europa.eu](http://www.ec.europa.eu)).

Estes princípios estão relacionados com a colheita e armazenamento de SCU e englobam o consentimento informado, proteção de dados pessoais, elucidação relacionada com benefícios na saúde, uso alogénico *versus* uso autólogo, bancos públicos *versus* bancos privados, sistemas de financiamento/custos, qualidade, garantia e rastreabilidade, publicidade e comercialização (Delgado *et al*, 2009; Petrini, 2010).

As opiniões de diversos países como Áustria, Bélgica, França, Irlanda e Itália são fundamentalmente unânimes, e um importante exemplo é o da França, em que o *Comité Consultatif National d'Étique pour les Sciences de la Vie et de la Santé* refere que as dificuldades éticas surgem devido à ideia de que o banco de SCU para uso exclusivo autólogo apresenta uma série de riscos. É um inconveniente para a sociedade na medida em que os bancos privados contrariam o princípio de solidariedade, sem a qual nenhuma sociedade sobrevive. Põem em risco a justiça e a equidade. A oferta deve ser sistemática, organizada, gerida e supervisionada por autoridades públicas. O custo do armazenamento para transplante autólogo é uma contradição com a obrigação de prestar cuidados de saúde com base na solidariedade e na consciência de prioridades. A gestão

pelo setor privado pode ser visto como discriminação com base na riqueza. A futilidade dos bancos para uso autólogo e o seu custo seria uma provocação aos olhos das classes mais necessitadas (Petrini, 2010).

Uma outra controvérsia diz respeito à proveniência da CE. O debate sobre a investigação com CE embrionárias está relacionada com a questão do que se considera o ser humano. A obtenção de CE embrionárias implica a utilização de embriões excedentários ou embriões após abortamento. A obtenção e utilização de CE providas de indivíduos já nascidos assim como o SCU ou adultos não têm suscitado questões éticas relevantes. Essas questões adquirem especial atenção quando a ciência pretende utilizar embriões para obter CE. A utilização de CE colhidas a partir de produtos de abortamento não tem revelado problemas éticos pelo que a interrupção do desenvolvimento intrauterino provoca inevitavelmente a sua morte.

O Conselho Nacional de Ética para as Ciências da Vida evidencia alguns argumentos éticos a favor e outros contra a utilização de embriões excedentários (Regateiro *et al*, 2005). A favor: “A utilização de embriões excedentários para fins de investigação apoia-se em duas razões ponderosas que a tornam preferível ao puro e simples abandono dos embriões: a dignidade e a solidariedade. (...) Parece mais digno que, em alternativa a uma destruição certa, as células de um embrião sirvam para o progresso do conhecimento científico, com a legítima expectativa de benefícios de tipo terapêutico para a espécie humana. (...) A solidariedade é em si um valor ético. (...) pode-se considerar como um bem que a massa celular interna dos embriões excedentários seja utilizada para investigação, observando-se o consentimento por parte dos responsáveis legais dos embriões utilizados. Os embriões tornar-se-ão deste modo parte ativa de um ato de solidariedade para com todos os indivíduos da espécie humana, esperando que do progresso da ciência e da terapêutica resulte uma melhoria ou a recuperação do seu estado de saúde”. Contra: “a utilização de embriões excedentários para fins de investigação baseia-se fundamentalmente na exigência de respeito que o embrião, seja ele criopreservado ou não, merece em função daquilo que ele é. Considera-se o embrião como sendo já um membro da família humana, dotado de um património genético praticamente não susceptível de repetição na história da humanidade. (...) O embrião é considerado como revestido de toda a dignidade que o ser humano merece, uma vez que, se lhe forem concedidas as condições de desenvolvimento, estará em condição de dar origem a um indivíduo adulto”.



## **8. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As CE do SCU apresentam inúmeras aplicações terapêuticas em doenças hematológicas, justificando-se assim a sua criopreservação para uso alogénico. A possibilidade de expansão, a capacidade de diferenciação em diferentes tipos celulares e a terapia celular abrem portas à aplicação destas células do SCU a outras patologias que não hematológicas. Neste sentido surge a controvérsia da criopreservação do SCU em bancos públicos ou privados.

Há um crescente reconhecimento de que o SCU de dador não aparentado obtido a partir de bancos públicos representa um valor inestimável de fonte de CE para doentes pediátricos e adultos com necessidade de transplante. As unidades SCU são particularmente úteis em doentes de grupos étnicos pelo que as exigências de HLA compatível com o uso SCU são menores comparativamente com MO de dadores não aparentados.

Os bancos devem estar cientes da necessidade de concretização das normas internacionais, tendo como principal objetivo promover a qualidade de todas as fases da colheita e processamento do SCU. Estas normas abrangem metodologia relativamente ao recrutamento, colheita, análises maternas e do SCU, processamento, criopreservação, tornando a unidade SCU disponível para transplante, diretamente ou através de um processo de pesquisa para seleção de unidades de SCU. Na maioria das fases é necessário especial cuidado na manipulação da unidade de SCU evitando contaminações bacterianas. Quando se refere “unidades de alta qualidade”, geralmente pensa-se em unidades de SCU com grande volume e com um elevado número de CE para garantir uma rápida recuperação hematopoiética. No entanto, este conceito refere-se à conformidade da unidade de SCU com as normas estabelecidas.

## 9. BIBLIOGRAFIA

Ademokun, J.A. Chapman, C. Dunn, J. Lander, D. Mair, K. Proctor, S.J. e Dickinson, A.M. (1997) Umbilical cord blood collection and separation for haematopoietic progenitor cell banking. *Bone Marrow Transplant* **19**, 1023-1028;

Ali, H. e Bahbahani, H. (2010) Umbilical cord stem cells – potential therapeutic tool for neural injuries and disorders. *Acta Neurobiol Exp* **70**, 316-324;

Armitage, S. Fehily, S.A. Dickinson, A. Chapman, C. Navarrete, C. e Contreras, M. (1999A) Cord blood banking: volume reduction of cord blood units using a semi-automated closed system. *Bone Marrow Transplant* **23**, 505-509;

Armitage, S. Warwick, R. Fehily, D. Navarrete, C. e Contreras, M. (1999B) Cord blood banking in London: the first 1000 collections. *Bone Marrow Transplant* **24**, 139-145;

Ballen, K.K. (2005) New trends in umbilical cord blood transplantation. *Blood* **105**, 3786-3792;

Ballen, K.K. Barker, J.N. Stewart, S.K. Greene, M.F. e Lane, T.A. (2008) Collection and Preservation of Cord Blood for Personal Use. *Biol Blood Marrow Transplant* **14**, 356-363;

Barile, L. Altomare, C. e Zaza, A. (2011) Induced pluripotent stem cells: progress towards a biomedical application. *Expert Rev Cardiovasc* **9**, 1265-1269;

Barker, J.N. Byan, C. e Scaradavou, A. (2011) How I treat: the selection and acquisition of unrelated cord blood grafts. *Blood* **117**, 2332-2339;

Bartels, U. Huber, H.M. Kleiner, K. Volkers, P. Seitz, R. e Heiden, M. (2009) Evaluation of Quality Parameters for Cord Blood Donations. *Transfus Med Hemother* **36**, 317-324;

Becton e Dickinson (2000) Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide. San Jose;

Berz, D. McCormack, E.M. Winer, E.S. Colvin, G.A. e Quesenberry, .P.J (2007) Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *Am J Hematol* **82**, 463-472;

Bizzeto, R. Bonfim, C. Rocha, V. Socié, G. Locatelli, F. Chan, K. Ramirez, O. Stein, J. Nabhan, S. Miranda, E. Passweg, J. Souza, C.A. e Gluckman, E. (2011) Outcomes after related and unrelated umbilical cord blood transplantation for hereditary bone marrow failure syndromes other than Fanconi anemia. *Haematologica* **96**, 134-141;

Boitano, A.E. Wang, J. Romeo, R. Bouchez, L.C. Parker, A.E. Sutton, S.E. Walker, J.R. Flaveny, C.A. Perdew, G.H. Denison, M.S. Schultz, P.G. e Cooke, M.P. (2010) Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science* **329**, 1345-1348;

Broxmeyer, H.E. Hangoc, G. Cooper, S. Ribeiro, R.C. Graves, V. Yoder, M. Wagner, J. Vadhan-Raj, S. Benninger, L. Rubinstein, P. *et al.* (1992) Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc Natl Acad Sci* **89**, 4109-4113;

Broxmeyer, H.E. Douglas, G.W. Hangoc, G. Cooper, S. Bard, J. English, D. Arny, M. Thomas, L. e Boyse, E.A. (1989) Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 3828-3832;

Brunstein, C.G. (2011) Umbilical Cord Blood Transplantation for treatment of hematologic malignances. *Cancer Control* **18**, 222-236;

Busby, H. (2010) The meanings of consent to the donation of cord blood stem cells: perspectives from an interview based of a public cord blood in England. *Clin Ethics* **5**, 22-27;

Cabeleira, A. Vieira, M. Matos, T. Gomes, A. e Rivera D. (2010) O sangue do cordão umbilical em medicina regenerativa: uma revisão dos avanços científicos mais recentes. *Acta Obstet Ginecol Port* **4**, 81-87;

Castro Jr, C.G. Gregianin, L.J. e Brunetto, A.L. (2001) Transplante de medula óssea e transplante de sangue de cordão umbilical em pediatria. *J Pediatr* **77**, 345-360;

Chang, J.W. Hung, S.P. Wu, H.H. Wu, W.M. Yang, A.H. Tsai, H.L. Yang, L.Y. e Lee, O.K. (2011) Therapeutic effects of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell transplantation in experimental lupus nephritis. *Cell Transplant* **20**, 245-257;

Charbord, P. Newton, I. Voillat, L. Schaal, J.P. e Herve, P. (1996) The purification of CD34 cells from human cord blood: comparison of separation techniques and cytokine requirements for optimal growth of clonogenic progenitors. *Br J Haematol* **94**, 449-454;

Chen, A. e Clowry G.J. (2011) Could autologous cord blood stem cell transplantation treat cerebral palsy? *Translat Neuros* **2**, 207-218;

Chen, S.H. Zheng, Y.J. Yang, S.H. Yang, K.L. Shyr, M.H. e Ho, Y.H. (2008) Microbial contamination of the Tzu-Chi Cord Blood Bank from 2005 to 2006. *Acta Paediatr Taiwan* **49**, 9-13;

Chou, S. Chu, P. Hwang, W. e Lodish, H. (2010) Expansion of human cord blood hematopoietic stem cells for transplantation. *Cell Stem* **7**, 427-428;

Ciesla, B. (2007) Hematology in Practice. Pennsylvania: F.A. Davis Company. p. 16-21;

Conrad, P.D. e Emerson. S.G. (1998) *Ex vivo* expansion of hematopoietic cells from umbilical cord blood for clinical transplantation. *J Leukoc Biol* **64**, 147-155;

Delgado, V.M. Garza, B.N. e Martinez, E.V. (2009) Ethical issues relating to the banking of umbilical cord blood in Mexico. *BMC Med Ethics* **10**, 12;

Doan, P.L. e Chao, N.J. (2010) Advances in cord blood transplants in adults. *Med Rep* **2**, 12-13;

Donaldson, C. Buchanan, R. Webster, J. Laundry, V. Horsley, H. Barron, C. Anderson, N. Bradley, B. e Hows, J. (2000) Development of a district Cord Blood Bank: a model for cord blood banking in the National Health Service. *Bone Marrow Transplant* **25**, 899-905;

Eapen, M. Rocha, V. Sanz, G. Scaradavou, A. Zhang, M.J. Arcese, W. Sirvent, A. Champlin, R.E. Chao, N. Gee, A.P. Isola, L. Laughlin, M.J. Marks, D.I. Nabhan, S.

Ruggeri, A. Soiffer, R. Horowitz, M.M. Gluckman, E. e Wagner J.E. (2010) Effect of graft source on unrelated donor haemopoietic stem-cell transplantation in adults with acute leukaemia: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* **11**, 653-660;

Egashira, T. Yuasa, S. e Fukuda, K. (2011) Induced pluripotent stem Cells in Cardiovascular Medicine. *Stem Cells Int* **2011**, 1-7;

Fernandez, C.V. Gordon, K. Hof, M. Taweel, S. e Baylis, F. (2003) Knowledge and attitudes of pregnant women with regard to collection, testing and banking of cord blood stem cells. *CMAJ* **168**, 695-698;

Fisk, N.M. Roberts, I.A. Markwald, R. e Mironov, V. (2005) Can Routine Commercial Cord Blood Banking Be Scientifically and Ethically Justified? *Plos Med* **2**, 87-90;

Forraz, N. e McGuckin, C.P. (2011) The umbilical cord blood: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. *Cell Prolif* **44**, 60-69;

Gassas, A. (2011) Cord stem-cell transplantation in Ontario: do we need a public bank? *Curr Oncol* **18**, 121-125;

Gluckman, E. (2009) History of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* **44**, 621-626;

Gluckman, E. Arcese, W. Locatelli, F. Rubella, P. Madnigal, A. Toubert, A. Velardi, A. Baudoux, E e Navarrete, C. (2011) World Cord Blood Congress III. Italy: European School of Haematology;

Gluckman, E. Broxmeyer, H.A. Auerbach, A.D. Friedman, H.S. Douglas, G.W. Devergie, A. Esperou, H. Thierry, D. Socie, G. Lehn, P. *et al.* (1989) Hematopoietic reconstitution in a patient in a Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* **321**, 1174-1178;

Gomes, T.L. e Pranke, P. (2008) Comparison between preterm and full-term newborn umbilical cord blood stem cells: a review. *RBAC* **40**, 25-30;

Gyurkocza, B. Rezvani, A. e Storb, R.F. (2010) Allogenic hematopoietic cell transplantation: the state of art. *Expert Rev Haematol* **3**, 285-299;

Haller, M.J. Viener, H.L. Wasserfall, C. Brusko, T. Atkinson, M.A. e Schatz, D.A. (2008) Autologous umbilical cord blood infusion for type 1 diabetes. *Exp Hematol* **36**, 10-15;

Honohan, A. Olthuis, H. Bernardts, A.T. Beckhoven, J.M. e Brand, A. (2002) Microbial contamination of cord blood stem cells. *Vox Sang* **82**, 32-38;

Hunt, C.J. (2011) Cryopreservation of Human Stem Cells for Clinical Application: A Review. *Transf Med Hemother* **38**, 107-123;

Iacone, A. Garcia, J. Wernet, P. Bonfini, T. e Rebulla, P. (2009) Organisational, technical and clinical aspects of cord blood banking. European School of Transfusion Medicine;

Kang, K. Kim, S.W. Oh, Y.H. Yu, J.W. Kim, K.Y. Park, H.K. Song, C.H. e Han, H. (2005) A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: a case study. *Cytotherapy* **7**; 368-373;

Keeney, M. Chin-Yee, I. Weir, K. Popma, J. Nayar, R. e Sutherland, D.R. (1998) Single Platform Flow Cytometric Absolute CD34+ Cell Counts Based on the ISHAGE Guidelines. *Cytometry* **34**, 61-70;

Kierszenbaum, A. (2007) Histology and Cell Biology: an Introduction to Patology. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Elsevier. p. 178-183;

Knudtzon, S. (1974) In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* **43**, 357-361;

Kurtzberg, J. Laughlin, M. Graham, M.L. Smith, C. Olson, J.F. Halperin, E.C. Ciocchi, G. Carrier, C. Stevens, C.E. e Rubinstein, P. (1996) Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med* **335**, 157-166;

Kurtzberg, J. Lyerly, A.D. e Sugarman, J. (2005) Untying the Gordian knot: policies, practices, and ethical issues related to banking of umbilical cord blood. *J Clin Invest* **115**, 2592-2597;

Kutzberg, J. Prasad, V.K. Carter, S.L. Wagner, J.E. Baxter-Lowe, L.A. Wall, D. Kapoor, N. Guinan, E.C. Feig, S.A. Wagner, E.L. e Kernan, N. (2008) Results of the Cord Blood Transplantation Study (COBLT): clinical outcomes of unrelated donor umbilical cord blood transplantation in pediatric patients with hematologic malignancies. *Blood* **112**, 4318-4327;

Lauber, S. Latta, M. Klüter, H. e Steinhardt, M. (2010) The Mannheim Cord Blood Bank: Experiences and Perspectives for the Future. *Transfus Med Hemother* **37**, 90-97;

Lee, S.J. Klein, J. Haagenson, M. Baxter-Lowe, L.A. Confer, D.L. Eapen, M. Fernandez-Vina, M. Flomenberg, N. Horowitz, M. Hurley, C.K. Noreen, H. Oudshoorn, M. Petersdorf, E. Setterholm, M. Spellman, S. Weisdorf, D. Williams, T.M. e Anasetti, C. (2007) High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood* **110**, 4576-4583;

Lubin, B.H. e Shearer, W.T. (2007) Cord Blood Banking for Potencial Future Transplantation. *Pediatrics* **119**, 165-170;

Ma, N. Stamm, C. Kaminski, A. Li, W. Kleine, H.D. Müller-Hilke, B. Zhang, L. Ladilov, Y. Egger, D. e Steinhoff, G. (2005) Human cord blood cells induce angiogenesis following myocardial infarction in NOD/scid-mice. *Cardiovasc Res* **66**, 45-54;

Malgieri, A. Kantzari, E. Patrizi, M.P. e Gambardella S. (2010) Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of art. *Int J Clin Exp Med* **3**, 248-269;

McKenna, D. e Sheth, J. (2011) Umbilical cord blood: Current status & promise for the future. *Indian J Med Res* **134**, 261-269;

McKenna, D.H. e Brunstein, C.G. (2011) Umbilical cord blood: current status and future directions. *Vox Sang* **100**, 150-162;

Mugishina, H. Harada, K. Chin, M. Suzuki, T. Takagi, K. Hayakawa, S. Sato, K. Klein, J.P. e Gale, R.P. (1999) Effects of long-term cryopreservation on hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant* **23**, 395-396;

Navarrete, C. e Contreras, M. (2009) Cord blood banking: a historical perspective. *Br J Haematol* **147**, 236-245;

NetCord-FACT (2010) International standards for cord blood collection, banking and release for administration. 4<sup>th</sup> ed;

Ohtaki, H. Ylostalo, J.H. Foraker, J.E. Robinson, A.P. Reger, R.L. Shioda, S. e Prockop, D.J. (2008) Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 14638-14643;

Onteniente, B. e Polentes, J. (2011) Regenerative medicine for stroke - are we there yet? *Cerebrovasc Dis* **31**, 544-551;

Petrini, C. (2010) Umbilical cord blood collection, storage and use: ethical issues. *Blood Transfus* **8**, 139-148;

Petrini, C. e Farisco, M. (2011) Informed consent for cord blood donation. A theoretical and empirical study. *Blood Transfus* **9**, 292-300;

Proctor, S.J. Dickinson, A.M. Parekh, T. e Chapman, C. (2001) Umbilical cord blood banks in the UK. *BMJ* **323**, 60-61;

Querol, S. Mufti, G.J. Marsh, S.G. Pagliuca, A. Little, A.M. Shaw, B.E. Jeffery, R. Garcia, J. Goldman, J.M. e Madrigal, J.A. (2009A) Cord blood cells for hematopoietic stem cell transplantation in the UK: how big should the bank be?. *Haematologica* **94**, 536-541;

Querol, S. Rubenstein, P. Marsh, S.G. Golman, J. e Madrigal, J. (2009B) Cord blood banking: providing cord blood banking for a nation. *Br J Haematol* **14**, 227-235;



Reed, W. Smith, R. Dekovic, F. Lee, J.Y. Saba, J.D. Trachtenberg, E. Epstein, J. Haaz, S. Walters, M.C. e Lubin, B.H. (2003) Comprehensive banking of sibling donor blood for children with malignant and nonmalignant disease. *Blood* **101**, 351-357;

Regateiro, F. Soares, J. Antunes, J.L. Fevereiro, P. Cabral, R.A. e Renaud, M. (2005) Relatório sobre Investigação em Células Estaminais. Conselho Nacional de Ética para a Ciências da Vida.

Reimann, V. Creutzig, U. Kögler, G. (2009) Stem Cells Derived From Cord Blood in Transplantation and Regenerative Medicine. *Dtsch Arzteb Int* **106**, 831-836;

Riedel, S. Junkins, A. Stamper, P.D. Cress, G. Widness, J.A. e Doern, G.V. (2009) Comparison of the Bactec 9240 and BacT/Alert Blood Culture Systems for Evaluation of Placental Cord Blood for Transfusion in Neonates. *J Clin Microbiol* **47**, 1645-1649;

Robinson, S.N. Simmons, P.J. Yang, H. Alousi, A.M. Marcos, J.L. e Shpal E.J. (2011) Mesenchymal stem cell in ex vivo cord blood expansion. *Best Pract Res Clin Haematol* **24**, 83-92;

Rodrigues, C.A. Sanz, G. Brunstein, C.G. Sanz, J. Wagner, J.E. Renaud, M. Lima, M. Cairo, M.S. Fürst, S. Rio, B. Dalley, C. Carreras, E. Harousseau, J.L. Mohty. M. Taveira, D. Dreger, P. Sureda, A. Gluckman, E. e Rocha, V. (2009) Analysis of risk factors for outcomes after unrelated cord blood transplantation in adults with lymphoid malignancies: a study by the Eurocord-Netcord and lymphoma working party of the European group for blood and marrow transplantation. *J Clin Oncol* **27**, 256-263;

Roitt, I. Brostoff, J. e Male, D. (1999) Immunology. 5<sup>th</sup> ed. London: Elsevier.p.83-92;

Rubinstein, P. Taylor, P.E. Scaradavou, A. Adamson, J.W. Migliaccio, G. Emanuel, D. Berkowitz, R.L. Alvarez, E. e Stevens, C.E. (1994) Unrelated placental blood for bone marrow reconstitution: organization of the placental blood program. *Blood Cells* **20**, 587-596;

Sato, A. Ooi, J. Takahashi, S. Tsukada, N. Kato, S. Kawakita, T. Yagyu, T. Nagamura, F. Iseki, T. Tojo, A. e Asano, S. (2011) Unrelated cord blood transplantation after

myeloablative conditioning in adults with advanced myelodysplastic syndromes. *Bone Marrow Transplant* **46**, 257-261;

Schlechta, B. Wiedemann, D. Kittinger, C. Jandrositz, A. Bonaros, N.E. Huber, J.C. Preisegger, K.H. e Kocher, A.A. (2010) Ex-Vivo Expanded Umbilical Cord Blood Stem Cells Retain Capacity for Myocardial Regeneration. *Circ J* **74**, 180-194;

Senegaglia, A. C. Rebelatto, C.L. Suss, P.H. e Brofman, P.R. (2009) Expansão de células-tronco da medula óssea e do sangue do cordão umbilical. *Rev Bras Hematol Hemater* **31**, 9-14;

Sideri, A. Neokleous, N. Grange, P.B. Guerton, B. Kerdilles, M.C. Uzan, G. Tsilimidos, C. e Gluckman, E. (2011) An overview of the progress on double umbilical cord blood transplantation. *Haematol* **96**, 1213-1220;

Smythe, J. Armitage, S. McDonald, D. Pamphilon, D. Guttridge, M. Brown, J. Green, A. Brown, C. Warwick, R.M. Lankester, A. Fehily, D. Contreras, M. Navarrete, C. e Watt, S.M. (2007) Directed Sibling a Cord Blood Banking for Transplantation: The 10-Year Experience in the National Blood Service in England. *Stem Cells* **25**, 2087-2093;

Solves, P. Moraga, R. Saucedo, E. Perales, A. Soler, M.A. Larrea, L. Mirabet, V. Planelles, D. Carbonell-Uberos, F. Monleón, J. Planells, T. Guillén, M. Andrés, A. e Franco, E. (2003) Comparison between two strategies for umbilical cord blood collection. *Bone Marrow Transplant* **31**, 269-273;

Sparrow, R.L. Cauchi, J.A. Ramadi, L.T. Waugh, C.M. e Kirkland, M.A. (2002) Influence of mode of birth and collection on WBC yields of umbilical cord blood units. *Transfusion* **42**, 210-215;

Takahashi, K. e Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676;

Thornley, I. Eapen, M. Sung, L. Lee, S.J. Davies, S.M. e Joffe, S. (2009) Private Cord blood Banking: Experiences and Views of pediatric Hematopoietic cell transplantation Physicians. *Pediatrics* **123**, 1011-1017;

Till, J.E. e McCulloch, E.A. (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* **14**, 213-222;

Trounson, A. Thakar R.G. Lomax, G e Gibbons, D. (2011) Clinical trials for stem cell therapies. *BMC Med* **9**, 52-58;

Volpe, G. Santoditocco, M. Di Mauro, L. Miscio, G. Boscia, F.M. Muto, B. e Volpe, N. (2011) Four phases of checks for exclusion of umbilical cord blood donors. *Blood transfus* **9**, 286-291;

Wall, D.A. e Chan, K.W. (2008) Selection of cord blood unit(s) for transplantation. *Bone Marrow Transplant* **42**, 1-7;

[www.arsnorte.min-saude.pt](http://www.arsnorte.min-saude.pt) [Acedido em 21 de Dezembro de 2011];

[www.asst.min-saude.pt](http://www.asst.min-saude.pt) [Acedido em 27 de outubro de 2011];

[www.chnorte.min-saude.pt/lusocord.php](http://www.chnorte.min-saude.pt/lusocord.php) [Acedido em 27 de Outubro de 2011];

[www.ec.europa.eu/european\\_group\\_ethics/publications/docs/publop19\\_en.pdf](http://www.ec.europa.eu/european_group_ethics/publications/docs/publop19_en.pdf) [Acedido em 1 de Novembro de 2011];

[www.eurocord.org](http://www.eurocord.org) [Acedido em 27 de Outubro de 2011];

[www.netcord.org](http://www.netcord.org) [Acedido em 27 de Outubro de 2011];

Young, B. Lowe, J.S. Stevens, A. e Heath, J.W. (2006) Weather's Functional Histology – A text and Colour Atlas. 5<sup>th</sup> ed. UK: Elsevier. p. 58-64.